

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**



NUEVAS APROXIMACIONES PARA EL ESTUDIO Y TERAPIA GÉNICA DE LA ANEMIA DE FANCONI.

**TESIS DOCTORAL DE:
Rocío Baños García**

**BAJO LA DIRECCIÓN DE:
Paula Río Galdo
Juan Antonio Bueren Roncero**

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



**NUEVAS APROXIMACIONES PARA EL
ESTUDIO Y TERAPIA GÉNICA DE LA
ANEMIA DE FANCONI.**

ROCÍO BAÑOS GARCÍA
TESIS DOCTORAL
Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



NUEVAS APROXIMACIONES PARA EL ESTUDIO Y TERAPIA GÉNICA DE LA ANEMIA DE FANCONI.

Memoria presentada por **Rocío Baños García** para optar al grado de doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Directores de tesis:

Dra. Paula Río Galdo

Dr. Juan A. Bueren Roncero

Rocío Baños García
TESIS DOCTORAL
2014

El trabajo de investigación descrito en esta memoria ha sido realizado en la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) y del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) y la Unidad Mixta de Terapias Avanzadas CIEMAT/ I.I.S. Fundación Jiménez Díaz.

Para su ejecución el trabajo de investigación realizado ha contado con la colaboración de los siguientes Programas de Investigación:

- Séptimo Programa Marco del Comisión Europea (Proyecto PERSIST; Ref 222878).
- Ministerio de Economía y Competitividad (Proyectos PLE 2009/0100; SAF 2009-07164 y SAF2012-39834).
- Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (RETICS-RD06/0010/0015 and RD12/0019/0023).
- Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid (Proyecto CellCAM Ref S2010/BMD-2420).
- Fundació Privada La Marató de TV3 (Proyecto 121430/31/32).
- Programa de transferencia de tecnología en el campo de la terapia génica de la Fundación Botín.

Rocío Baños García ha disfrutado de una beca predoctoral CIEMAT.

INDICE

SUMMARY	2
RESUMEN	4
I. INTRODUCCIÓN.	
1. ANEMIA DE FANCONI: GENERALIDADES	8
1.1. Ruta de Anemia de Fanconi/BRCA: Señalización y reparación de daño inducido en el ADN.	8
1.2. Características clínicas de Anemia de Fanconi.	12
1.2.1. Variaciones en el fenotipo de los pacientes.	12
1.3. Principales características fenotípicas de células de AF y su uso para el diagnóstico de la AF.	13
2. TERAPIAS UTILIZADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA ANEMIA DE FANCONI.	15
2.1. Terapias convencionales	15
2.2. Terapias experimentales para el tratamiento de AF.	16
3. MODELOS EXPERIMENTALES EN ANEMIA DE FANCONI.	18
3.1. Descripción de modelos animales existentes.	18
3.2. Generación de nuevos modelos de AF.	19
4. GENERACIÓN DE SISTEMAS <i>KNOCKDOWN</i>	20
4.1. Sistemas de represión de la expresión génica: Biología de <i>ARN</i> s.	20
4.1.1. Pequeños <i>ARN</i> s interferentes: Inhibición transitoria de la expresión de un gen	21
4.1.2. Pequeñas horquillas de <i>ARN</i> s: Inhibición estable de la expresión de un gen.	22
4.2. Mecanismos para realizar la inhibición estable de la expresión de un gen utilizando vectores que portan <i>shARN</i> s.	23
5. TERAPIA GÉNICA.	24
5.1. Terapia Génica: Tipos.	25
5.1.1. Factores relevantes para el desarrollo de protocolos de terapia génica.	26
5.2. Terapia Génica Dirigida.	29
5.2.1. DSBs y sistemas de reparación del ADN.	30
5.2.2. Herramientas utilizadas en la modificación del genoma.	34
6. CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES DE LAS NUCLEASAS EN INGENIERÍA GENÉTICA.	36
6.1. Meganucleasas.	36
6.2. Nucleasas TALE	37
6.3. Endonucleasa de ADN dependiente de ARN Cas9 del sistema CRISPR (<i>CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>)	38
6.4. Nucleasas de Dedos de Zinc (ZFN, <i>Zinc finger nucleases</i>)	40
7. TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA CON ZFNs.	42
7.1. Aplicaciones de las nucleasas ZFN en terapia génica	42
7.2. Mecanismos de introducción del ADN donador y los ZFN en el núcleo celular.	44
7.3. Factores a tener en cuenta en el uso de ZFN	46
8. SITIOS SEGUROS PARA LA INTEGRACIÓN DE GENES EN EL GENOMA HUMANO	48
9. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS: UNA NUEVA FUENTE CELULAR PARA SU USO EN TERAPIA GÉNICA.	50
9.1. Métodos para la generación de iPSCs	52

9.1.1.Reprogramación por factores de transcripción exógenos	53
9.1.2.Reprogramación por reclutamiento autónomo no celular de los factores endógenos OKSM.....	53
9.2. Fuentes celulares para la generación de iPSCs	54
10.iPSCS Y TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA: FUTURAS APLICACIONES TERAPEÚTICAS.	55
II. OBJETIVOS	60
III. MATERIAL Y MÉTODOS.	
1. MODELOS ANIMALES.....	64
2. TIPOS CELULARES UTILIZADOS.....	65
2.1. Purificación de células CD34 ⁺ de sangre de cordón umbilical.....	66
3. VECTORES.....	67
3.1. Vectores Lentivirales	67
3.1.1. Descripción de vectores lentivirales utilizados	67
3.1.2. Generación de sobrenadantes lentivirales utilizando células 293T.....	69
3.1.3. Titulación de vectores lentivirales	71
3.2. Vectores Adenovirales.....	73
4. HORQUILLAS PEQUEÑAS DE ARN: shARNs	73
4.1. Diseño de horquillas pequeñas de ARN (shARNs).....	73
4.2. Clonaje de los shARNs en el vector lentiviral LVTHM	74
5. INTRODUCCIÓN DE MUTACIONES SILENTES EN EL GEN hFANCA EN EL VECTOR PGK.FANCA.WPRE*	75
6. TRANSDUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES Y CÉLULAS PRIMARIAS.....	76
6.1. Transducción con vectores lentivirales que expresan shARNs frente al gen FANCA.....	76
6.1.1. Transducción de células adherentes.....	76
6.1.2. Transducción de células en suspensión	76
6.2. Transducciones dirigida a la generación de iPSCs derivadas de fibroblastos AF-A corregidos por RH.....	77
7. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN	78
8. EXPANSIÓN DE CÉLULAS CD34 ⁺ INTERFERIDAS PARA FANCA EN PRESENCIA DE MMC O TNFα.....	78
8.1. Sensibilidad a Mitomicina C (MMC)	78
8.2. Sensibilidad al Factor de Necrosis Tumoral α (TNFα)	79
9. GENERACIÓN DE UNIDADES FORMADORA DE COLONIAS (UFCs)	79
9.1. Estudio de UFCs en células interferidas para el gen FANCA	79
9.2. UFCs para el estudio de la corrección de iPSCs AF-A editadas genéticamente	79
10.ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO Y SEPARACIÓN CELULAR.....	80
11. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR QPCR	82
11.1. Análisis de ARNm de FANCA	82
11.2. Expresión de genes de pluripotencia en clones de iPSCs	82

12. ANÁLISIS DE NÚMERO DE COPIAS POR Q-PCR	83
13. DETECCIÓN DE LA INTEGRACIÓN DEL CASETE DE RH POR PCR	84
14. SOUTHERN BLOT: INTEGRACIÓN DEL VECTOR VLDI:RH-FANCA EN EL GENOMA	85
15. SECUENCIACIÓN DE LA MUTACIÓN EN UN PACIENTE AF-A	86
16. ANÁLISIS DE METILACIÓN EN PROMOTORES DE OCT4 Y NANOG	87
17. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE FANCA Y FANCD2 MEDIANTE WESTERN BLOT	88
18. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE MARCADORES CELULARES E IDENTIFICACIÓN DE TEJIDOS	89
18.1. Identificación de marcadores celulares	89
18.1.1. Análisis de focos nucleares de FANCD2 por Inmunofluorescencia	89
18.1.2. Estudio de la pluripotencia en iPSCs por inmunocitoquímica y tinción con fosfatasa alcalina	90
18.2. Análisis de teratomas mediante tinción de hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica.	91
19. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD CROMOSÓMICA	91
19.1. Análisis de cariotipo y aberraciones cromosómicas	91
19.2. Estudios de alteraciones en iPSC mediante matriz de CGH	92
20. DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA MEDIANTE LA FORMACIÓN DE CUERPOS EMBRIONARIOS (EB)	93
21. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	94
21.1. Estudio del injerto de células CD34 ⁺ interferidas en ratones inmunodeficientes	94
21.2. Generación de teratomas en ratones NSG con iPSC-Afeg	95
22. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	95

IV. RESULTADOS.

1. GENERACIÓN DE UN MODELO HUMANIZADO DE RATÓN DE AF-A UTILIZANDO VECTORES LENTIVIRALES PORTADORES DE shARNs (VL:shARNs)	98
1.1. Eficacia de diferentes VL:shARNs para inhibir la expresión de FANCA en células sanas	98
1.1.1. Capacidad de expansión disminuida en fibroblastos MRC5 que expresan shFANCA	98
1.1.2. Evolución de la intensidad media de fluorescencia a lo largo del tiempo	99
1.1.3. Inhibición de la ruta de AF a nivel molecular	99
1.1.4. Inhibición de la ruta de AF a nivel funcional: Ausencia de Focos nucleares FANCD2 ...	101
1.2. Inhibición de FANCA mediante VL:shARNs en progenitores hematopoyéticos CD34 ⁺ de sangre de cordón umbilical	103
1.2.1. Inhibición de focos nucleares de reparación de FANCD2 en células CD34 ⁺ interferidas	98
1.2.2. Capacidad de formación de colonias hematopoyéticas de células CD34 ⁺ interferidas en FANCA	104
1.2.3. Sensibilidad a agentes entrecruzantes del ADN	105
1.2.4. Estudio de la inestabilidad cromosómica en presencia de Diepoxibutano	105
1.2.5. Sensibilidad al TNF α	106
1.2.6. Estudio de la parada del ciclo celular y apoptosis	106
1.3. Desarrollo de un modelo humanizado de AF: Trasplante de células CD34 ⁺ interferidas en	

<i>FANCA</i> en ratones inmunodeficientes	108
1.3.1. Capacidad de injerto de células humanas CD34 ⁺ interferidas en <i>FANCA</i>	108
1.3.2. Caracterización fenotípica de los PHs obtenidos de ratones trasplantados con células CD34 ⁺ interferidas.	109
1.4. Estudio de nuevas aproximaciones terapéuticas utilizando el modelo humanizado de AF: Terapia Génica.....	111
1.4.1. Generación y eficacia del vector terapéutico PGK. <i>FANCA</i> .Wpre* con mutaciones silentes en <i>FANCA</i>	111
1.4.2. Terapia génica <i>in vitro</i> de células CD34 ⁺ interferidas en <i>FANCA</i>	112
1.4.3. Eficacia de la Terapia Génica para revertir el fenotipo de células interferidas en <i>FANCA</i> en el modelo de ratón humanizado	113
2. GENERACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DERIVADOS DE IPSCS A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON ANEMIA DE FANCONI-A CORREGIDOS MEDIANTE TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA EN UN SITIO SEGURO	116
2.1. Análisis de la eficacia de la recombinación homóloga en células de Anemia de Fanconi	116
2.2. Terapia génica dirigida en fibroblastos de pacientes de AF-A	119
2.2.1. Determinación de la MOI del vector de donador de RH (VLDI: RH- <i>FANCA</i>) en células de AF-A	120
2.2.2. Corrección de fibroblastos de AF-A mediante editado génico	121
2.2.3. Estudio de la corrección fenotípica de fibroblastos de pacientes de AF-A mediante edición génica	124
2.3. Generación de iPSCs a partir de fibroblastos de AF-A corregidos mediante edición génica ..	126
2.3.1. Eficiencia de generación de iPSCs a partir de fibroblastos AF-A en presencia o ausencia de <i>hTERT</i>	126
2.3.2. Análisis de iPSCs-eg generadas a partir de fibroblastos AF-52Teg	128
2.4. Estudio de la pluripotencia de las iPSCs-AFeg generadas a partir de fibroblastos de AF-A editados genéticamente.....	131
2.4.1. Detección por inmunohistoquímica de marcadores de pluripotencia	131
2.4.2. Expresión de genes endógenos y exógenos de pluripotencia	132
2.4.3. Generación de teratomas en ratones inmunodeficientes	133
2.4.4. Hipometilación de los promotores de <i>OCT3/4</i> y <i>NANOG</i>	134
2.5. Estudio de la corrección de iPSCs-AF editados genéticamente	135
2.5.1. Estudio de la expresión del gen <i>hFANCA</i> en los clones de iPSC-AFeg.....	135
2.5.2. Estudio de la corrección fenotípica de los clones de iPSC-AF editados genéticamente	136
2.6. Generación de iPSCs-AF editadas genéticamente más seguras: Escisión de los genes de reprogramación.....	138
2.6.1. Caracterización de las iPSC tras la escisión	139
2.6.2. Estudio de la expresión de <i>hFANCA</i> en el clon escindido	140
2.6.3. Estudio de la estabilidad cromosómica en el clon escindido.....	141

2.7. Análisis del cariotipo y estudios de la variación del número de copias mediante una matriz de CGH.....	141
2.8. Generación de Progenitores Hematopoyéticos corregidos a partir de iPSCs AF-A editadas genéticamente	143
2.8.1. Diferenciación hematopoyética <i>in vitro</i> a través de la formación de cuerpos embrionarios	143
2.8.2. Capacidad de formación de colonias a partir de Progenitores Hematopoyéticos diferenciados de iPSC AF-A editados genéticamente	144
2.8.3. Resistencia a MMC de Progenitores Hematopoyéticos diferenciados de iPSC AF-A editadas genéticamente.....	144
V. DISCUSIÓN	
1. GENERACIÓN DE UN MODELO HUMANIZADO DE RATÓN DE AF-A UTILIZANDO VL:shARNs	148
1.1. Diseño de diferentes VL:shARNs frente al gen <i>FANCA</i>	149
1.2. Eficacia de diferentes VL:shARNs para inhibir la expresión de <i>FANCA</i> en células sanas	151
1.3. Inhibición de <i>FANCA</i> mediante VL:shARNs en células CD34 ⁺ procedentes de sangre de cordón	154
1.4. Desarrollo de un modelo humanizado de AF: Trasplante de células CD34 ⁺ interferidas en ratones inmunodeficientes	157
1.5. Estudio de nuevas aproximaciones terapéuticas utilizando el modelo de la enfermedad generado: Eficacia de la Terapia Génica.....	159
2. GENERACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DERIVADOS DE iPSCS A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CORREGIDOS MEDIANTE TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA EN UN SITIO SEGURO DEL GENOMA.....	161
2.1. Evaluación de la posibilidad de llevar a cabo protocolos de recombinación homóloga en células de AF.....	162
2.2. Terapia génica dirigida en fibroblastos de pacientes de AF-A	163
2.3. Generación de iPSCs a partir de fibroblastos de AF-A corregidos mediante edición génica ..	165
2.4. Diferenciación eficiente de iPSCs-AFeg a Progenitores Hematopoyéticos corregidos	170
VI. CONCLUSIONES	174
VII. BIBLIOGRAFÍA	178
VIII. ANEXO	212

ABREVIATURAS

A

aa _s	Aminoácidos
AAVs	Virus adenoasociados (<i>Adeno-associated virus</i>)
AAVS1	El sitio 1 del virus adenoasociado (<i>Adeno-associated virus type 1</i>)
Ac	Anticuerpo
aCGH	array mediante la hibridación comparativa del genoma (<i>Comparative genomic hybridization</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico codificante
ADNg	ADN genómico
ADN-PKs	Subunidad catalítica proteína quinasa dependiente de ADN
AdV	Vectores adenovirales
AF	Anemia de Fanconi
AF-A	Pacientes con anemia de Fanconi del grupo de complementación A
Alb	Albúmina
AP	Fosfatasa alcalina
APC	Aloficocianina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNbc	ARN bicatenario
ARNi _s	ARNs de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ATCC	Colección americana de líneas celulares (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATR	Ataxia telangiectasia y Rad3-related

B

BAC	Baculovirus
BFU-Es	Unidad formadora de colonias eritroides (<i>Burst forming unit-erythroid</i>).
BIR	Replicación inducida por rotura (break-induced replication)
BSP	PCR específica de bisulfito (<i>bisulfite-specific PCR</i>)

C

CCR5	C-C quimionina receptora de tipo 5
CIP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (<i>calf intestinal phosphatase alkaline</i>)
Cisplatino	Cis-diaminodicloroplatino II
CMA	Célula Madre Adulta
CME	Célula madre embrionaria
CMEhs	Líneas de células madre embrionarias humanas (CMEhs)
CMF	Célula madre fetales
CMH	Células madre hematopoyéticas
CMM	Células madre mesenquimale o estromales
CMPS	Células Madre Progenitoras
CMS	Células madre somática
CMV	Citomegalovirus (Cytomegalovirus).
CoDA	<i>Context-Dependent Assembly</i>

CPE	Células progenitoras endoteliales
cPPT	Región central del tracto de polipurina
CR	Cantidad relativa
CreR	Proteína CreRecombinasa
CRISP	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CRISPR/Cas	Proteínas asociadas a CRISP
CU	Cordón Umbilical
CY	Ciclofosfamida

D

DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEB	Diepoxibutano
DGP	Diagnóstico genético preimplantacional
DMEN	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.
DS	Donante Sano
DSB	Rotura de doble cadena en el ADN (<i>DSB</i> , del inglés <i>Double Strand Break</i>)

E

E2A	Péptido 2A autoescindible obtenido del virus de la rinitis
EB	Cuerpos embrionarios (<i>Embryo bodies</i>)
EBV	Virus Epstein-Barr
EF-1 α	Factor de elongación 1 alfa
EG	Editado génico
eGFP	Proteína verde fluorescente (<i>enhanced green protein</i>)
EH	Endonucleasas <i>homing</i>
EICH	Enfermedad injerto contra huésped
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EPO	Eritropoyetina

F

F2A	Péptido 2A autoescindible obtenido del virus de la enfermedad del pie y la boca (virus Coxsackie).
FAAP24	Proteína asociada a AF 24kDa
FAN1	Nucleasa 1 asociada a AF (<i>FA-associated nuclease 1</i>)
FANCD2-Ub	FANCD2 monoubiquitinada
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMO	Fallo de médula ósea
<i>FokI</i>	Dominio <i>FokI</i> (del procariota <i>Flavobacterium okeanoikoites</i>)

G

g	gramos
GALV	Virus de la leucemia del mono Gibbon (<i>Gibbon Ape leukemia virus</i>)
G-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas
GEFA	Registro alemán de AF (<i>German Fanconi anemia Registry</i>)

Gn Generación

Gy Gray

H

h Horas

hExo1 Exonucleasa humana I

hFANCA Gen humano *FANCA*

HFF-1 Fibroblastos humanos de prepucio, línea HFF-1 (*Human foreskin fibroblasts*)

HLA Antígeno leucocitario humano (*human leukocyte antigen*)

HSV1-TK *Herpes Simplex Virus Type I Thymidine Kinase*

hTERT Subunidad catalítica de la Telomerasa humana

I

ICLs Enlaces cruzados intercatenarios o entrecruzantes (*Interstrand cross-linking*)

IDLV Vectores lentivirales no integrativos (*Integrase defective lentiviral vector*)

IFAR Registro internacional de AF (*Internacional Fanconi anemia Registry*)

IFN- γ Interferón gamma

IL-1 β Interleuquina 1 β

IL-3 Interleuquina 3

IL-6 Interleuquina 6

IMDM Medio de cultivo Dulbecco modificado por Iscove.

IMF Intensidad Media de Fluorescencia

indel inserción- delección

IP Yoduro de propidio.

iPSC-AFeg iPSCs derivadas de fibroblastos AF-A editados genéticamente

iPSCs Células madre pluripotentes inducidas (*Induced pluripotent stem cells*).

IRES Sitio Interno de entrada al Ribosoma (*Internal Ribosome Entry Site*)

K

Kb Kilobases

KDa KiloDalton

KI Knock-in

Klf4 *Kruppel-like factor 4*

KO Knock-down

Kpb Kilopares de bases.

L

l litro

LCLs Líneas celulares linfoblastoides

LMA Leucemia mieloide aguda

LTRs Secuencias repetidas largas de los extremos (*Long Terminal Repeats*)

M

mCherry Proteína Cherry de ratón.

MGN Meganucleasas

MHF1 y MHF2 *Histone fold Protein 1 y 2*

miARNs microARNs

Min Minutos

MMC Mitomicina C

MO Médula Ósea

MOI Multiplicidad de infección (*Multiplicity of infection*)

MOPS Tampón de 3-morfolino-1-propanosulfonato

MRN Complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)

N

NAC N-acetilcisteína

NER Reparación por escisión de nucleótidos (*Nucleotide excision repair*)

NF- κ B Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NHEJ Reparación por unión de extremos no homólogos (Non homologous end-joining)

nM Nanomolar

NOD/SCID NOD.CB17-PrkdcScid/J

NOG NOD/Shi-scid IL2^{rgnull}

O

O/N *Overnight*

Oct4 *Octamer-binding transcription Factor 4*

OKSM Factores de transcripción denominados Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc

OPEN *Oligomerized Pool Engineering*

ORF Marco de lectura abierto (*open reading frame*)

P

pb Pares de bases

PBS Solución salina tamponada con fosfato.

PBS Sitio de unión del iniciador (*Primer Binding Site*)

PCR Reacción en cadena de la polimerasa.

PE Ficoeritrina

PGK Fosfoglicerato quinasa (*Phosphoglycerate kinase*)

PHs Progenitores hematopoyéticos

piARNs ARNs asociados a PIWI

PKcs-ADN Subunidad catalítica proteína quinasa dependiente de ADN

PNAS Ácidos péptidos-nucleicos

PolIII ARN polimerasa III

PPP1R12C Subunidad reguladora 12C del gen de fosfatasa (PPP1R12C, también conocido como MBS85)

PPT Fragmento de polipurinas (*Polypurine Tract*, PPT)

PRE Elementos reguladores post-transcripcionales (*Post-transcriptional regulatory element*)

Q

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

R

RAMPs	<i>Repeat-associated mysterious proteins</i>
RDOs	Oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN
RFP	Proteína roja fluorescente
RH	Recombinación homóloga
RHD	Recombinación homóloga directa
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
ROS	Especies reactivas del oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
RPA	Proteína de replicación A
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Trascriptasa Reversa (<i>reverse transcriptase</i>)
RT-PCR	PCR tras retrotranscripción del ARN
RT-qPCR	PCR cuantitativa tras una RT-PCR.
RV	Vectores Gammaretrovirales.
RVD	Diresiduo variable repetido (<i>Repeat variable diresidue</i>)

S

s	Segundos
SB	Southern Blot
SCC	Tampón salino de citrato sódico
SDFs	Pequeños fragmentos de ADN (<i>Small DNA fragments</i>)
SDS	Lauril Sulfato
SELEX	Evolución de ligandos sistemática por enriquecimiento exponencial
SFFV	Virus formador de colonias esplénicas (<i>Spleen Focus Forming Virus</i>).
SFHR	Pequeños fragmentos homólogos (<i>Small fragments homology repair</i>)
shARN	Horquillas pequeñas de ARN (<i>short hairpin RNA</i>)
siARNs	ARNs pequeños de interferencia (<i>small interfering RNA</i>)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIN	Secuencias autoinactivantes (<i>self-inactivating</i>)
SMD	Síndrome mielodisplásico
SN	Sobrenadante
snARN	ARN pequeño nuclear (<i>small nuclear RNA</i>)
Sox2	<i>SRY-related HMG-box 2</i>
SSA	Anillamiento de cadena única (<i>single-strand annealing</i>)
ssODN	Oligo-desoxirribonucleótidos de cadena sencilla (<i>single-stranded oligodeoxyribonucleotides</i>)
STEMMCA	Casete de las células madre (<i>Stem Cell Cassete</i>)

T

TALEN	Nucleasas TALE (<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>)
TBS	Solución salina tamponada con Tris (Tris buffered saline)
TBS-T	TBS Tween
TC	Tricolor
TetO	Operador de Tetraciclina

TFOs	Oligonucleótidos formadores de tripletes (<i>Triplex-forming oligonucleotides</i>)
TLS	Síntesis frente a lesiones (<i>TransLesion Synthesis</i>)
TMO	Trasplante de médula ósea
TNCS	Transferencia nuclear de células somáticas
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TSS	Sitio de inicio de la transcripción (<i>Transcription start site</i>)

U

U	Unidad
UAF1	Factor 1 asociado a USP (<i>USP1-associated factor 1</i>)
UBZ4	<i>Ubiquitin binding zinc finger 4</i>
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UFC-GM	Unidad formadora de colonias granulo-macrofágicas.
USP1	Enzima USP1 (<i>ubiquitin specific peptidase 1</i>)
UT	Unidades de transfección
UTR	Regiones no traducidas del gen (<i>untranslated region</i>)
UV	Luz ultravioleta

V

VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana (Human immunodeficiency virus).
VL	Vectores lentivirales
VLDI	Vectores lentivirales deficiente en integración (<i>Integrase defective lentiviral vector</i>)=IDLV
VPA	Ácido valproico
VSV-G	Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (<i>Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G</i>)

W

WB	Western Blot
WHV	Virus de la hepatitis B de la marmota (<i>Woodchuck hepatitis virus</i>)
WPRE	Elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota

X

X-CGD	Granulomatosis crónica ligada al X
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Z

ZFNs	Nucleasas de dedos de Zinc (<i>Zinc Finger nucleases</i>)
ZFPx	Proteínas de dedos de zinc (<i>Zinc Finger Protein</i>)
ZFs	Dedos de Zinc (<i>Zinc Finger</i>)

Otros

μ L	Microlitro
---------	------------

Summary

Introduction.

Fanconi anemia (FA) is a rare disease mainly characterized by congenital malformations, high predisposition to cancer and aplastic anemia [1-3], which is the main cause of death in these patients [4, 5].

Objetives.

This work is specially focused on the generation of new experimental models that reproduce the aplastic anemia observed in FA patients and on the development of new therapies for the treatment of the bone marrow failure.

Results.

In order to develop new FA models resembling the bone marrow failure of FA patients, an experimental system based on the interference of *hFANCA* gene in hematopoietic stem cells (hHSCs) from human umbilical cord blood was generated. For this purpose, a lentiviral vector carrying an interfering RNA (LV:shRNA) against *hFANCA* was designed. This vector showed an efficient reduction of *hFANCA* expression both *in vitro* and *in vivo*. CD34⁺ cells from umbilical cord blood from healthy donors were transduced with this LV: shRNA allowing the generation of FA-like human hematopoietic progenitors (hHPs) which were transplanted into immunodeficient mice. Using this approach we could study the *in vivo* long-term FA behavior of FA like hHSCs. This model was also very useful to validate both *in vitro* and also *in vivo* the therapeutic efficacy of lentiviral vectors designed to restore the expression of *FANCA* [6].

Aiming to investigate new therapies for the treatment of FA patients, we designed a new gene therapy approach based on the generation of hHPs from reprogrammed FA-A fibroblasts, which were previously corrected by gene editing techniques. For this purpose a non-integrative lentiviral vector carrying homology sequences for a human safe harbor locus, *AAVS1* [7, 8], was constructed. Fibroblasts from FA-A patients were transduced with this vector together with a vector expressing Zinc finger nucleases (ZFN) targeting this locus, with the purpose of facilitating the integration of the *FANCA* gene in the *AAVS1* locus by homologous recombination (HR). Specific integration of one single copy of this gene in the genome of transduced cells allowed the correction of the FA phenotype. Once that FA phenotype was corrected, fibroblasts were reprogrammed to induced pluripotent stem cells (iPSCs) using a lentiviral vector expressing all four reprogramming factors described by Dr. Yamanaka [9, 10]. Once reprogrammed, corrected iPSCs were re-differentiated to hHPs which also showed a reversion of the FA phenotype.

Conclusions.

In conclusion, in this thesis we describe a new humanized FA-A mouse model useful to study the efficacy and safety of different therapies designed to prevent or mitigate the bone marrow

failure observed in this patients. Furthermore it has been demonstrated, as a proof of concept, the development of a novel therapeutic approach for the treatment of FA based on the generation of corrected hHPs using gene targeting and cell reprogramming techniques.

Resumen

Introducción.

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad de baja prevalencia caracterizada principalmente por una alta frecuencia de malformaciones congénitas, elevada predisposición al cáncer y aplasia medular [1-3], siendo ésta la principal causa de muerte de los pacientes [4, 5].

Objetivos.

Los principales objetivos de este trabajo han estado dirigidos a la generación de nuevos modelos experimentales que reproduzcan la aplasia medular de los pacientes con AF y al desarrollo de nuevas terapias del fallo medular.

Resultados.

Con objeto de desarrollar nuevos modelos de fallo medular de AF, se generó un sistema experimental basado en la interferencia del gen *hFANCA* en células madre hematopoyéticas humanas (hCMH) procedentes de sangre de cordón umbilical. Para ello se diseñó un vector lentiviral portador de un ARN interferente (VL:shARN) que reconoció el gen *hFANCA* y redujo su expresión tanto *in vitro* como *in vivo*. La transducción con este VL:shARN de células CD34⁺ procedentes de muestras de sangre de cordón umbilical de donantes sanos nos permitió generar progenitores hematopoyéticos humanos (hPHs) con fenotipo AF que fueron trasplantados en ratones inmunodeficientes. Mediante esta aproximación pudimos estudiar el comportamiento *in vivo* y a largo plazo de hCMH con fenotipo AF. Este modelo también nos facilitó la validación, tanto *in vitro* como *in vivo*, de la eficacia terapéutica de vectores lentivirales que restauraban la expresión del gen *FANCA* [6].

En segundo lugar y con el objetivo de investigar nuevas terapias para pacientes con AF diseñamos una aproximación basada en la generación de hPHs tras la reprogramación de fibroblastos de pacientes AF-A corregidos mediante técnicas de edición génica. Para ello, se construyó un vector lentiviral no integrativo con secuencias de homología de un *locus* del genoma humano previamente definido como un sitio seguro del genoma, el *locus AAVS1* [7, 8]. Los fibroblastos de pacientes con AF se transdujeron con este vector junto con un vector que expresaba nucleasas de dedos de Zinc (ZFN) dirigidas al mismo *locus* para, así, facilitar la integración por recombinación homóloga (RH) del gen *FANCA* en el *locus AAVS1*. La integración específica de una única copia de este gen en el genoma de las células transducidas posibilitó la corrección del fenotipo AF de las células de los pacientes. Una vez corregido el fenotipo de los fibroblastos AF-A, se reprogramaron a células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) con un vector lentiviral que expresaba los cuatro factores de reprogramación descritos por el Dr. Yamanaka [9, 10]. Las iPSCs con fenotipo corregido se rediferenciaron para generar progenitores hematopoyéticos en los que se validó la reversión del fenotipo de AF.

Conclusión.

En conclusión, a lo largo de esta tesis se presenta el desarrollo de un modelo humanizado de AF que podrá ser utilizado para estudiar la eficacia y seguridad de diferentes terapias con capacidad de prevenir y tratar la aplasia medular característica de la AF. Además se ha demostrado, como prueba de concepto, el desarrollo de una novedosa aproximación terapéutica para el tratamiento de la AF basada en la generación de PHs corregidos para el defecto genético a partir de técnicas de edición génica y reprogramación celular.

I. INTRODUCCIÓN

1. ANEMIA DE FANCONI: GENERALIDADES.

Los síndromes de fallo de médula ósea (MO) se caracterizan por la incapacidad de la MO para producir un número adecuado de células sanguíneas circulantes y generan una alta mortalidad en los pacientes que las padecen. Entre las patologías que generan dicho fallo de médula ósea se encuentra un grupo de enfermedades hereditarias tales como la disqueratosis congénita, síndrome de Shwachman-Diamond o la Anemia de Fanconi (AF).

La anemia de Fanconi fue descrita por primera vez en 1927 por el pediatra suizo Guido Fanconi [5, 11], tras observar en una familia con cinco hijos que tres de ellos presentaban diversas anomalías físicas, infecciones recurrentes, sangrados espontáneos y anemia severa cuyo resultado era una muerte prematura de los pacientes. Estudios en la sangre periférica de éstos y otros pacientes desembocaron en la conclusión de que esta enfermedad afectaba a todos los linajes hematopoyéticos, aunque la etiología de dicha alteración aún estaba muy lejos de ser determinada. No fue hasta el año 1964 cuando se empezó a vislumbrar la idea de que la causa de esta enfermedad se podría deber a un defecto en la reparación del ADN, fecha en la que Schroeder describió la inestabilidad cromosómica observada en las células de AF como un marcador de la enfermedad [12]; sin embargo, aún tuvieron que pasar casi 40 años para que su implicación en rutas de reparación del ADN fuera confirmada.

Actualmente se han descrito 16 genes AF implicados en una ruta denominada Fanconi/Susceptibilidad al cáncer de mama (AF/BRCA) involucrada en la reparación de enlaces intercatenarios del ADN (del inglés, *interstrand cross-linking*, ICLs). El fallo en el funcionamiento de estos genes impide que dicha reparación se lleve a cabo, lo que limita la supervivencia celular y aumenta la inestabilidad génica, contribuyendo al desarrollo progresivo de fallo medular y predisposición al cáncer en los pacientes de AF [1, 13]. La heterogeneidad genética responsable de esta enfermedad aumenta la complejidad de su estudio y de la búsqueda de terapias efectivas para prevenir y/o tratar una de las manifestaciones más graves de la patología, el fallo de médula ósea. Por ello, diversos trabajos, entre los que se incluye el nuestro, están dirigidos al desarrollo de nuevas aproximaciones para estudiar y tratar el problema hematológico de la AF.

1.1. Ruta de Anemia de Fanconi/BRCA: Señalización y reparación de daño inducido en el ADN.

La AF está causada por mutaciones en la línea germinal en genes que cooperan en una ruta de reparación del ADN especializada en la reparación de entrecruzamientos del ADN, una lesión fatal que bloquea tanto la replicación del ADN, como su transcripción [14]. Desde 1992, cuando se identificó el primer gen implicado en el desarrollo de esta enfermedad, *FANCC*, [15] hasta la fecha de hoy se han caracterizado un total de 16 genes de AF (Tabla 1). La existencia de una sintomatología común en los pacientes de AF hizo pensar que los genes implicados en la enfermedad debían estar interaccionando en una ruta común. A pesar de que la función de los 16 genes implicados en AF no se conoce totalmente, se ha descrito que actúan de forma conjunta y junto a otros genes implicados en reparación en la ruta AF/BRCA (Fig. 1) implicada en la detección y reparación de dobles roturas del ADN. El funcionamiento de esta ruta se divide en las siguientes etapas detalladas a continuación:

- ✚ **Activación de la ruta:** Ocho de las proteínas (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL y FANCM) interaccionan de forma específica para formar un complejo ubiquitin E3 ligasa conocido como **complejo “core” (núcleo) de AF** que en respuesta a daño en el ADN (estrés genotóxico) o durante la fase S del ciclo celular, promueven la monoubiquitinación de FANCD2 y FANCI [16]. Se ha descrito que FANCM es la subunidad encargada de iniciar la ruta. Esta proteína forma un heterodímero con la proteína FAAP24 (Proteína asociada a AF 24kDa) [17]. Este complejo tiene varias funciones en la activación de la ruta tales como el reconocimiento de la lesión en el ADN, el posterior reclutamiento del *core* de AF a la zona de daño y el inicio de la señalización mediada por ATR (ataxia telangiectasia y Rad3-related) [17-19]. La asociación estable de FANCM a la cromatina ocurre gracias a la acción de MHF1 y MHF2 (*Histone fold Protein 1 y 2*), lo que aumenta la eficiencia de la ruta [20]. Además, junto con el complejo FANCM-FAAP24-MHF1/2, el complejo de reparación de desapareamiento de bases MutS también tiene un papel redundante en la localización del daño en el ADN y la activación de la ruta, promoviendo el reclutamiento del *core* AF a la cromatina [21]. Durante el proceso de activación múltiples proteínas de AF se fosforilan por quinasas ATR-CHK1, lo que demuestra una interconexión de la ruta de AF con la señalización de respuesta al daño en el ADN [22]. Así pues, se ha propuesto que el proceso de activación de la ruta ocurriría de la siguiente forma: en las células que se encuentran en fase G₁ las proteínas del *core* están ensambladas pero no se asocian con FANCM/FAAP24 en la cromatina; en fase S, FANCM se fosforila y recluta el *core* de AF hacia la cromatina, facilitando la monoubiquitinación de FANCD2 y FANCI; y, finalmente, durante las fases G₂/M, FANCM se hiperfosforila y se permite la liberación del *core* AF de la cromatina. De este modo FANCM actuaría movilizándolo el núcleo de AF a la cromatina [23].
- ✚ **Monoubiquitinización de FANCD2 y FANCI:** Una vez activada la ruta, el siguiente paso es la monoubiquitinización de FANCD2 y FANCI por el *core* de AF. En concreto, esta reacción está mediada por la actividad ubiquitin ligasa E3 de FANCL, que junto con la enzima UBE2T E2, monoubiquitina la lisina (Lys) 561 de FANCD2 y la Lys 523 de FANCI respectivamente [24, 25]. El complejo heterodimérico FANCD2-I (ID) una vez monoubiquitinizado se activa y migra a los focos de reparación en el núcleo (*foci* nucleares), donde interacciona con proteínas de AF (D1/J/N/O/P) y otras proteínas implicadas en la reparación del ADN situadas aguas abajo. Es importante reseñar que FANCD2 y FANCI son interdependientes para su monoubiquitinización, ya que células carentes en una de las dos proteínas no presentan la otra monoubiquitinada [26].
- ✚ **Corte en la zona dañada:** FANCD2 monoubiquitinada (FANCD2-Ub) promueve el reclutamiento de múltiples nucleasas del ADN implicadas en la reparación de ICLs, tales como FAN1 (*FA-associated nuclease 1*) y SLX4 (FANCP) hacia el sitio donde se ha producido la ICL para así iniciar la incisión nucleolítica [27]. Estas proteínas contienen un dominio de unión denominado UBZ4 (*ubiquitin binding zinc finger 4*) que reconoce de forma específica la ubiquitina de FANCD2 [28, 29]. La nucleasa SLX4 asociada con MUS81-EME1 y XPF asociada con ERCC1 promueven el corte en la zona de la lesión [30]. Este evento genera una rotura de doble cadena en el ADN (DSB, del inglés *Double Strand Break*) y mediante el mecanismo de síntesis a través de la lesión (TLS, del

inglés *TransLesion Synthesis*), proceso que implica la acción de ADN polimerasas especializadas capaces de copiar el ADN dañado, se restaura la cadena de ADN.

- ✚ **Reparación del daño:** Por último, la DSB generada es reparada por recombinación homóloga (RH), los aductos (bases modificadas) remanentes lo hacen por reparación por escisión de nucleótidos (NER, del inglés *nucleotide excision repair*) y los huecos existentes son rellenados por las ADN polimerasas. Aunque el mecanismo aún no está completamente descrito, en el proceso de RH tienen un papel esencial las proteínas de AF situadas aguas abajo (FANCD1/FANCI/FANCD2/FANCI) que regulan directamente la actividad de RAD51 en el sitio de daño y están implicados en la resolución de los intermediarios de recombinación. Por último, el complejo ID (FANCD2Ub-FANCIUb) es desubiquitinado gracias a la enzima USP1 (del inglés *ubiquitin specific peptidase 1*) en asociación con UAF1 (del inglés *USP1-associated factor 1*) [31, 32].

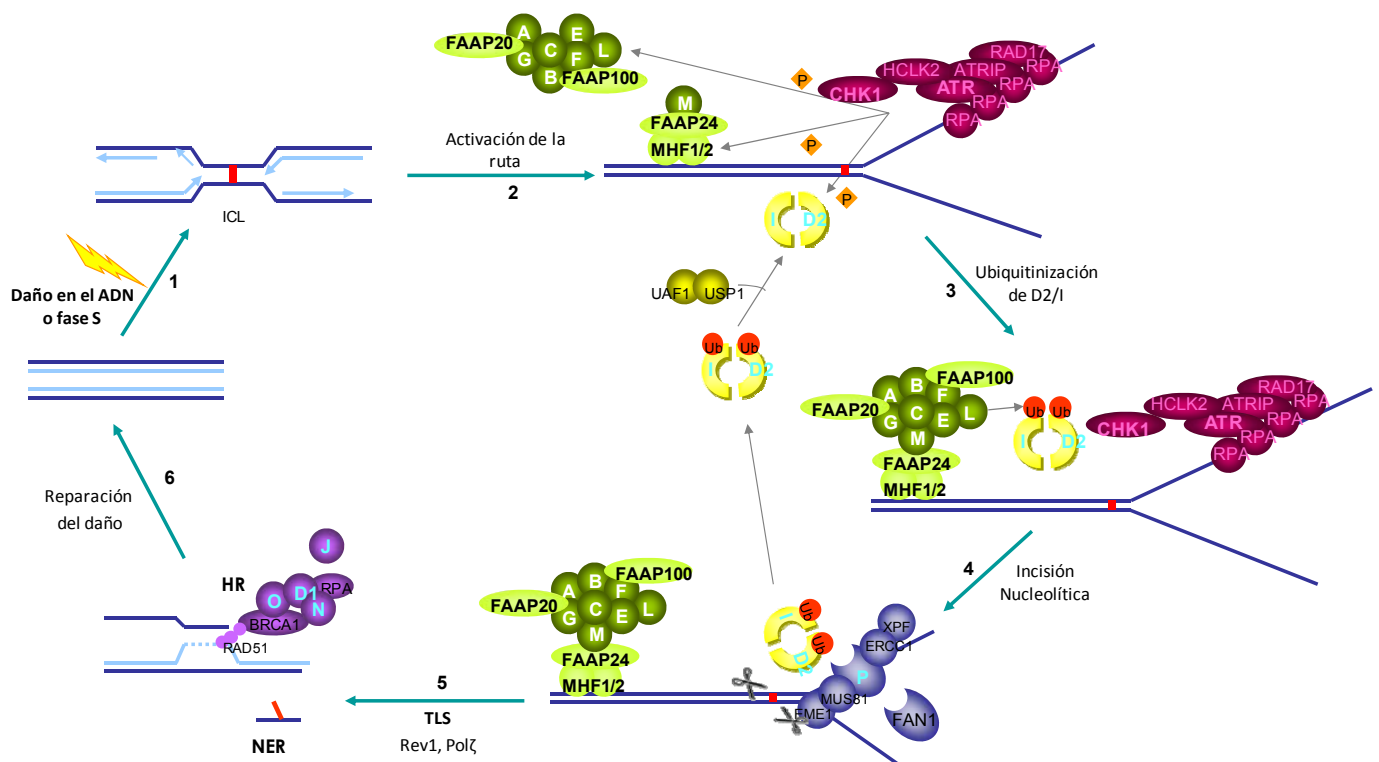


Figura 1. Ruta de Anemia de Fanconi/BRCA. Tras la generación de una ICL (1), la señal mediada por ATR activa la ruta y sella la horquilla de replicación, fosforilando múltiples proteínas (2) de la ruta y dirigiendo la activación del núcleo de AF y la monoubiquitinización del heterodímero FANCD2/FANCI (3). Este complejo monoubiquitinizado recluta las nucleasas FAN1 y FANCP, que junto con otras nucleasas llevará a cabo la incisión nucleolítica cerca del sitio de entrecruzamiento del ADN (4). Además este complejo quizás también reclute polimerasas de TLS (*translesion synthesis*) y factores de RH (5). Esto permite la reparación del daño (6) y finalmente, ocurre la desubiquitinización de FANCD2/FANCI por medio de USP1/UAF1. [Modificada de Kee & D'Andrea (2012) y de Kim & D'Andrea (2012)].

A pesar del conocimiento ya existente de las proteínas que forman parte de la compleja ruta de AF, aún queda mucho por investigar para dilucidar completamente todas las interacciones, funciones y detalles de las proteínas implicadas en la ruta de AF.

Grupo de complementación (gen) ¹	% pacientes (internacional)	% pacientes (España)	Localización cromosoma	Proteína (aas)	Función proteica	Referencias
A (FANCA)	66	84,1	16q24.3	1455	Miembro del complejo "core". Fosforilado por la quinasa ATR en la Ser 1449.	[34, 35]
B (FANCB)	< 2	--	Xp22.2	859	Miembro del complejo "core"	[36]
C (FANCC)	~ 14	--	9q22.3	558	Localizado en el núcleo y citoplasma. Miembro del complejo "core", pero también funciona independientemente del complejo	[15]
D1 (FANCD1=BRCA2)	~ 3	1,1	13q12.3	3418	Recluta RAD51 y promueve la reparación por RH. Interactúa con FANCG, FAND2 y PALB2. Gen de susceptibilidad a cáncer	[37, 38]
D2 (FANCD2)	~ 3	3,4	3p25.3	1451	Monoubiquitinizado por el complejo "core" de AF y fosforilado por ATR, y probablemente por ATM, tras el daño en el ADN. Recluta FAN1 y FANCP a la cromatina.	[39]
E (FANCE)	~ 3	1,1	6p21.3	536	Miembro del complejo core. Funciona como puente entre el complejo core y FANCD2.	[40]
F (FANCF)	~ 2	--	11p15	374	Proteína adaptadora flexible requerida para ensamblar el complejo "core" de AF	[41]
G (FANCG=XRCC9)	~ 10	2,3	9p13	622	Multifuncional por su localización en el complejo AF y también en RH por la interacción con FANCD1, FANCD2 y XRCC3	[42, 43]
I (FANCI)	~ 1	--	15q26.1	1268	Monoubiquitinizado por el complejo AF dependiente de FANCD2. Se fosforila tras el daño a ADN	[44-48]
J (FANCJ=BRIP1/BACH1)	~ 2	2,3	17q23.1	1249	ATPasa dependiente de ADN y helicasa de ADN 5'→3'. Se une directamente al dominio BRCT de BRCA1. Gen de susceptibilidad a cáncer.	[44, 49-51]
L (FANCL=PHF9)	~ 0,2	--	2p16.1	375	Miembro del complejo "core" con actividad ubiquitin-ligasa. Recluta UBE2T via el dominio PHD E3. Monoubiquitina FANCD2 y FANCI.	[52]
M (FANCM=Hef)	~ 0,2	--	14q21.3	2048	Miembro del complejo "core" con actividad translocasa y un dominio endonucleasa. Actúa como el sensor de daño en el ADN y moviliza el núcleo de AF al sitio de daño.	[53]
N (FANCN=PALB2)	~ 0,7	--	16p12.1	1186	Media la interacción entre BRCA1 y BRCA2 durante la RH. Gen de susceptibilidad a cáncer	[54-57]
O (FANCO=RAD51C)	~ 0,2	--	17q22	376	Participa en varios complejos proteicos implicados en RH. Interactúa con RAD51 y homólogos de RAD51. Gen de susceptibilidad a cáncer	[58]
P (FANCP=SLX4)	~ 0,2	--	16p13.3	1834	Interactúa con las endonucleasas MUS81-EME1 y XPF-ERCC1, promoviendo el corte del extremo 3'. Implicado en la resolución de intermediarios de RH como las uniones Holliday con SLX1.	[59, 60]
Q (FANQ=ERCC4/XPF)	~ 0,2	1,1	16p13.12	916	Es una nucleasa específica en reparación de entrecruzamientos e interacciona con SLX4.	[61]

Tabla 1. Grupos de complementación en Anemia de Fanconi. En la tabla se muestran las frecuencias de los diferentes grupos de complementación, localización cromosómica de los genes implicados, así como la función de las proteínas de la ruta. Los datos mostrados están basados en los recogidos por Shimamura y Alter [5], Kee y D'Andrea [62] y Casado y col. [33] principalmente.

¹ Los pacientes de AF se clasifican en 16 grupos de complementación, asignado según el gen de la ruta de AF que tengan defectuoso. Para ello se determina el gen defectuoso bien mediante fusión de células de pacientes de AF con células con el gen a estudio inhibido, o bien mediante la expresión del gen FANCA a estudio utilizando vectores virales [33].

1.2. Características clínicas de Anemia de Fanconi.

La anemia de Fanconi (AF) se clasifica como una enfermedad de baja prevalencia ya que se manifiesta en 1-5 casos por 100.000 nacimientos con una frecuencia de portadores de 1/300 [63], aunque esta proporción se ve incrementada en grupos altamente consanguíneos como ocurre en el caso de la etnia gitana española, cuya frecuencia de portadores, 1 por cada 67 nacimientos, es la más elevada del mundo [64].

A pesar de la heterogeneidad genética, los enfermos de AF comparten una sintomatología común presentando malformaciones congénitas en un 70% de los casos, como son la baja estatura, cabeza y ojos pequeños, anomalías en el dedo pulgar y el brazo, hipo o hiperpigmentación (manchas café con leche), además de anomalías estructurales en el corazón, riñón y otros órganos [4, 65, 66].

Sin embargo, el principal síntoma de esta enfermedad y la causa primaria de mortalidad es el progresivo fallo de médula ósea (FMO) que se manifiesta en el 80% de los casos y que hace que la supervivencia de los pacientes se sitúe alrededor de los 25 años [4, 67, 68]. Este FMO se manifiesta en un 75% durante la primera década de vida, aunque datos clínicos del registro internacional de AF (*Internacional Fanconi anemia Registry*, IFAR) y del Registro alemán de AF (*German Fanconi anemia Registry*, GEFA) sugieren que virtualmente todos los pacientes de AF desarrollarían FMO a la edad de 40 años [69, 70]. El fallo en la médula ósea es detectado inicialmente como macrocitosis seguida de trombocitopenia o leucopenia. Posteriormente, entre los 5 y 10 años de edad se manifiesta pancitopenia que suele empeorar con el tiempo, así como neutropenia que se asocia con un incremento del riesgo de infecciones. Finalmente, estas disfunciones hematológicas pueden desembocar en un fallo severo de médula ósea que tiene una tasa de riesgo de ocurrencia del 5% por año a partir de la edad de 10 años.

Además del FMO, la susceptibilidad a padecer cáncer está incrementada en los pacientes de AF. De este modo, el 33% de los pacientes a la edad de 40 años presentan leucemia mieloide aguda (LMA) o síndrome mielodisplásico (SMD). Además de estos desórdenes hematológicos, los pacientes de AF tienen un riesgo más elevado de desarrollar tumores sólidos, especialmente carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello, piel, esófago y cáncer vulvar en las mujeres [26, 70, 71].

1.2.1. Variaciones en el fenotipo de los pacientes.

A pesar de que para todos los pacientes de AF se ha definido una sintomatología común, existe una notable variabilidad clínica tanto en la manifestación de las anomalías congénitas que expresan como en el desarrollo del fallo de médula ósea y neoplasias [69, 72]. Aunque se ha intentado correlacionar el genotipo de cada paciente con la manifestación clínica, sólo se han observado unas pocas conexiones entre el fenotipo y genotipo, ya que existen otros muchos factores que modulan la expresión de los diferentes síntomas, tales como la edad, ambiente, otras alteraciones genéticas, etc. [72]. A continuación, se mostrarán dos efectos que modulan el fenotipo observado en los pacientes.

Mosaicismo Somático.

El descubrimiento del fenómeno conocido como mosaicismo somático fue observado en pacientes que no llegaban a manifestar alteraciones hematológicas o que, a pesar de manifestarlas

en periodos iniciales de la enfermedad se observaba una recuperación de los valores hematológicos. Este fenómeno se detectó en células del sistema hematopoyético y se produce por la reversión espontánea de la mutación en uno de los alelos del gen que está alterado en ese paciente, generándose una proteína funcional que permite la restauración de la ruta de AF/BRCA. De este modo, la célula revertida presenta un fenotipo equivalente al de una célula sana [73-76]. A nivel hematológico, si la reversión ocurre en un progenitor hematopoyético, éste desarrolla una ventaja proliferativa que le confiere la capacidad de expandirse clonalmente e ir reemplazando progresivamente las células defectivas en la ruta de AF en la médula ósea [77]. Así pues, en estos pacientes se produce un proceso denominado “terapia génica natural” [78], ya que cuando la reversión ocurre en una célula madre hematopoyética, los pacientes pueden llegar a alcanzar recuentos sanguíneos normales de manera estable en el tiempo [74-77].

■ Atenuación.

Para explicar la variabilidad fenotípica que presentan pacientes con la misma mutación - además del fenotipo recién descrito anteriormente, en 2010 se describió por primera vez un fenotipo singular que presentaban varios pacientes de AF en los que se observaban algunas de las características fenotípicas esenciales utilizadas para diagnosticar AF (elevado número de aberraciones cromosómicas tras daño celular y monoubiquitinización de FANCD2). Sin embargo, estos pacientes mostraban contajes hematológicos normales y no presentaban parada G2/M del ciclo celular tras su exposición a agentes entrecruzantes del ADN [79]. Este fenómeno clonal se denominó “atenuación del fenotipo de AF” [79], puesto que no existía reversión de la mutación causante de la enfermedad y no se trataba de pacientes mosaicos.

Las células atenuadas expresan bajos niveles de CHK1 y p53, siendo la inhibición de CHK1 la causante de proteger las células de AF de la muerte celular. El fenómeno de atenuación, por lo tanto, se asocia a pacientes con contajes hematológicos casi normales y, a menudo, con el desarrollo de SMD y LMA.

1.3. Principales características fenotípicas de células de AF y su uso para el diagnóstico de la AF.

Puesto que los 16 genes AF tienen un papel directo o indirecto en la reparación del ADN, las células deficientes en alguno de éstos presentan las siguientes características fenotípicas:

1. **Hipersensibilidad a agentes entrecruzantes del ADN tales como mitomicina C (MMC) y diepoxibutano (DEB), psoralenos fotoactivados o cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II, CDDP).** El tratamiento con estos agentes químicos induce un alto número de aberraciones cromosómicas (roturas cromatídicas, roturas cromosómicas, cromosomas radiales y cuarradiales...), característica que se ha utilizado para el diagnóstico de la enfermedad. De hecho, la primera herramienta para el diagnóstico de AF fue descrita por Schuler en 1969 y consistió en la observación del aumento de la fragilidad cromosómica en las células de pacientes tras su tratamiento con agentes alquilantes como la MMC [80]. Los principios de esta técnica, junto con modificaciones realizadas por Auerbach en 1988, siguen siendo los utilizados actualmente para el diagnóstico de la AF [81, 82].

2. **Parada del ciclo celular en G2/M.** Ocurre como consecuencia directa de la acumulación de horquillas de reparación bloqueadas por la incapacidad que tienen las células de AF de reparar el daño producido por agentes entrecruzantes del ADN [83-85]. Esta técnica se ha utilizado para la detección de la enfermedad, siendo especialmente útil en el caso de pacientes mosaicos. Estos pacientes son complicados de diagnosticar puesto que el estudio de la sangre periférica no muestra claramente los marcadores fenotípicos, por lo que se recurre al estudio de la parada de ciclo celular en G2/M en los fibroblastos de piel de los pacientes, tras su tratamiento con agentes entrecruzantes [72, 86].
3. **Hipersensibilidad a condiciones de oxígeno ambiental** como consecuencia de la desregulación del metabolismo de especies reactivas del oxígeno [87, 88], lo cual se refleja en un crecimiento *ex vivo* deficiente y una baja capacidad clonogénica. Por ello, para facilitar el crecimiento de las células de AF se suele recurrir a cultivarlas en condiciones de hipoxia (<5% de oxígeno) [89] como las existentes en la mayoría de los tejidos, incluyendo el nicho de la médula ósea [90, 91].
4. **Anomalías a nivel telomérico.** Los pacientes de AF poseen telómeros más cortos que individuos sanos de la misma edad y además, están frecuentemente alterados, aunque la actividad telomerasa está aumentada [92, 93]. Estas observaciones podrían ser debidas, entre otras causas, a la existencia de hematopoyesis hiperestimulada.
5. **Incremento de la apoptosis.** En las células de pacientes con AF se puede observar un aumento en la producción de citoquinas pro-apoptóticas tales como la interleuquina 6 (IL-6) [94], interferón gamma (IFN- γ) [95], Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) [94, 96] o interleuquina 1 β (IL-1 β) [97]. La sobreexpresión de TNF α e IFN- γ observada en la médula de ósea de los pacientes conlleva la hiperactivación de dos rutas implicadas en el fallo medular y la leucemiogénesis [98]: la cascada de señalización en respuesta a estrés p38MAPK [99] y NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) [100]. Así pues, muchos estudios actuales se centran en la disminución de los niveles de TNF α para mejorar el fenotipo de las células de AF [95, 101, 102].
6. **Defectos en adhesión y anidamiento celular.** Estos efectos son observados en progenitores hematopoyéticos de AF y se han asociado con una regulación aberrante de la actividad de Cdc42 [103].
7. **Defecto en la monoubiquitinización y movilización de FANCD2 a focos de reparación (*foci*).** Como ya se ha explicado anteriormente la monoubiquitinización de FANCD2 es imprescindible para que se recluten las proteínas implicadas en la reparación de las ICLs generadas en las células. La disfunción de alguna de las proteínas responsables de formar el complejo ubiquitin ligasa E3 impide la monoubiquitinización de FANCD2. Por ello, para pacientes con mutaciones en algunas de estas proteínas el análisis de la monoubiquitinización de FANCD2 puede ser una herramienta de diagnóstico [76, 104]. La monoubiquitinización de FANCD2 puede ser observada mediante Western Blot (WB) con la aparición de dos bandas de parecido peso molecular aunque diferenciables y la movilización de esta proteína

monoubiquitinada se puede detectar mediante inmunofluorescencia por observación de la formación de *foci* de FANCD2 en las zonas de daño [105].

2. TERAPIAS UTILIZADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA ANEMIA DE FANCONI.

2.1. Terapias convencionales.

Aunque la AF es una enfermedad sistémica, la mayor parte de las de las terapias de estos pacientes se centra en la mejora del problema hematológico de la enfermedad, que es la principal causa de muerte. Junto a esto, además, es de vital importancia la prevención y tratamiento de tumores a lo largo de la vida del paciente de AF.

El fallo medular severo se manifiesta por unos recuentos de neutrófilos menores de $0,5 \times 10^9$, de plaquetas inferior a 20×10^9 o hemoglobina menor a 8g/dl según el criterio de Camitta [106]. Los tratamientos iniciales para disminuir el fallo medular son principalmente paliativos, teniendo como objetivo estimular la producción de células del sistema sanguíneo. Entre ellos destacamos:

- ✦ **Andrógenos:** Estimulan la eritropoyesis, mejorando el recuento de eritrocitos y plaquetas hasta en un 75% de los individuos [107]. El andrógeno estándar utilizado es la oximetazona y el tratamiento debe llevarse a cabo cuando los pacientes presentan hematopoyesis propia residual [108]. El problema es que pueden tener efectos secundarios como la masculinización, ictericia, a la vez que se incrementa el riesgo de la generación de tumores hepáticos, por lo que se recomienda ajustar la dosis a la mínima [5, 109]. Uno de los andrógenos utilizados para el tratamiento del fallo de MO que está teniendo más éxito en la actualidad es el danazol, ya que además de retrasar el progresivo fallo de MO en los pacientes, muestra muchos menos efectos secundarios [110].
- ✦ **Factores de crecimiento:** Destaca la administración de G-CSF (factor estimulante de colonias granulocíticas), EPO (eritropoyetina), IL-3 (interleuquina 3) [111, 112]. La respuesta a estos tratamientos es parcial y transitoria, por lo que no se consideran como un tratamiento eficaz a largo plazo. Además, hay indicios que señalan que podrían acelerar el desarrollo de hematopoyesis clonal (SMD/LMA) y por lo tanto aumentar el riesgo de leucemia [66], por lo que no se utilizan en la actualidad.
- ✦ **Transfusiones:** Se suele utilizar de forma paralela al tratamiento con andrógenos y aunque mejoran el estado del paciente a nivel hematológico, se correlacionan con una menor eficacia del trasplante posterior.

El tratamiento ideal es el **trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas o progenitores hematopoyéticos** obtenidos de médula ósea, sangre de cordón umbilical o movilizados a sangre periférica; ya que es la única terapia curativa existente para las manifestaciones hematológicas que presentan los pacientes con AF (anemia aplásica, SMD y LMA). En la actualidad se recomienda que el trasplante se realice a edades tempranas, cuando el paciente no se encuentre en fase leucémica y preferiblemente que no haya recibido tratamiento con andrógenos y menos de 20 transfusiones de eritrocitos o una de plaquetas [113].

El donante ideal de progenitores hematopoyéticos es un donante familiar con HLA (*Human Leukocyte Antigens*) idéntico al del paciente. En este caso la supervivencia lograda es superior al 75%

durante los primeros 5 años post-trasplante [113-116]. En el caso de que los progenitores hematopoyéticos provengan de un donante alternativo la supervivencia se reduce de forma significativa en función del grupo de riesgo del paciente [117-119]. Los pacientes de AF son extremadamente sensibles a la toxicidad que presentan los regímenes de acondicionamiento comúnmente utilizados para el trasplante de médula ósea (TMO), tales como la quimioterapia y radioterapia, debido a los defectos que presentan en reparación del ADN; por lo que uno de los obstáculos de esta terapia lo constituye el propio régimen de acondicionamiento, por lo que se ha investigado en esta dirección para encontrar un régimen de acondicionamiento adecuado. En 1984 se realizó el primer régimen de acondicionamiento con éxito y consistía en una dosis baja de ciclofosfamida (CY) y una única dosis de irradiación total del cuerpo [120]. Desde entonces se han desarrollado protocolos de acondicionamiento dirigidos a limitar el uso de radiación y disminuir el riesgo de cáncer a largo plazo [108]. Actualmente se tiende a utilizar regímenes suaves de acondicionamiento utilizando fludarabina, un antimetabolito de alto efecto inmunosupresor, que limita la incidencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH) [121]. En el caso de donantes no emparentados uno de los protocolos de acondicionamiento que mejores resultados está cosechando es el que incluye fludarabina y depleción de células T [122, 123] y otro desarrollado por la Dra. MacMillan en 2009 en el que se aplica una dosis de irradiación total del cuerpo menor de 300 Gy utilizando una protección tímica (minimiza el daño en el timo y mejora la reconstitución inmune) combinado con dosis bajas de ciclofosfamida, fludarabina y globulina anti-timocito.

Como se puede observar, hasta el momento, la única terapia eficaz de la AF es el trasplante hematopoyético. Sin embargo, este tratamiento ofrece diversos inconvenientes:

- El éxito del trasplante depende de la existencia de un donante adecuado, idealmente HLA-idéntico y emparentado, ya que aunque se ha mejorado mucho el éxito en trasplantes de donantes alternativos, aún existe una significativa mortalidad y morbilidad [119] debido a que todavía hay que lidiar con problemas como el fallo de injerto, toxicidad relacionada con el régimen de acondicionamiento, enfermedad injerto contra huésped e infecciones oportunistas. Aún así, hay que mencionar que en el caso de donantes no relacionados la aplicación de regímenes de acondicionamiento que utilizan fludarabina ha permitido que la tasa total de supervivencia se incrementara del 13% al 52% respecto a aquéllos regímenes que no contenían este agente inmunosupresivo [119, 123].
- Puesto que las proteínas de AF están implicadas en la reparación del ADN, los pacientes con AF son altamente sensibles al tratamiento de acondicionamiento para el trasplante lo que puede acelerar el desarrollo de neoplasias secundarias. Esto es especialmente relevante en el caso de carcinomas escamosos de cabeza y cuello, asociados posiblemente a la reacción de EICH [124].

2.2. Terapias experimentales para el tratamiento de AF.

La falta de donantes para determinados tipos de pacientes, ya que de promedio sólo un 25% de los pacientes puede beneficiarse de un donante de familiar HLA-idéntico, ha contribuido a la búsqueda de terapias alternativas. Entre estas terapias debemos distinguir entre las que se están

aplicando actualmente o se van a aplicar en un futuro próximo en la clínica y aquellas que aún son, únicamente, una potencial posibilidad.

1. **Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (CMH) de hermanos seleccionados genéticamente:** Para ello es necesario realizar diagnóstico genético preimplantacional (DGP) que permite seleccionar embriones no portadores de la enfermedad y que sean HLA idénticos al paciente. Esta terapia se aplicó con éxito por primera vez en 2001 en una niña de Chicago [125, 126]. El inconveniente de esta terapia es que la técnica es muy complicada y la frecuencia de éxito, es decir, de generar un individuo sano HLA idéntico, aún es muy reducida.
2. **Nuevas terapias farmacológicas:**
 - ✦ **Utilización de anti-TNF α :** Como ya se ha mencionado anteriormente, las células de pacientes de AF presentan un sobreproducción de TNF α que induce la apoptosis de células de la MO. Se han realizado dos ensayos clínicos diferentes (en Génova, Italia y en Cincinnati, EEUU) en los que se ha utilizado el etanercept, una proteína dimérica de fusión que es capaz de inhibir el TNF α , con el objetivo de determinar si este fármaco puede ayudar en el tratamiento de FMO temprano de pacientes con AF [102]. Se concluyó que el etanercept es bien tolerado por los pacientes y puede ser administrado con seguridad, si bien no se disponen todavía de resultados de eficacia clínica.
 - ✦ **Uso de componentes antioxidantes:** Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son una de las principales fuentes que generan daño en el ADN, sobre todo en el caso de AF [127]. Estudios recientes muestran que la reducción de ROS con antioxidantes, como el resveratrol, el ácido α -lipoico o la N-acetilcisteína (NAC), corrige parcialmente el fenotipo de AF en modelos de ratón y cultivos celulares humanos [128, 129]. De este modo, se podrían utilizar estos compuestos como una aproximación profiláctica para retrasar los síntomas clínicos en pacientes de AF. Las limitaciones potenciales de este tratamiento es que el uso excesivo de antioxidantes puede tener un efecto rebote y causar daño en el ADN, induciendo apoptosis [62].
3. **Terapia génica en CMHs:** Aunque aún no se está aplicando, consistiría en el trasplante de células madre hematopoyéticas del propio paciente cuyo defecto haya sido corregido previamente mediante terapia génica [130]. El que se elijan las CMH como diana de la terapia se debe a que el sistema hematopoyético es un sistema altamente jerarquizado, en el cual a partir de una pequeña población de CMH (con capacidad pluripotente, alta capacidad de autorrenovación y baja tasa de proliferación) se generan los progenitores comprometidos que a su vez darán lugar a todos los linajes hematopoyéticos. De ello se deduce que la corrección del gen de AF en las CMH implicaría que todas las células de los diferentes linajes hematopoyéticos se corrigieran. La idea de que la terapia génica pueda ser eficaz en los enfermos con AF que no disponen de un donante HLA idéntico se basa en varias evidencias previas:
 - La AF es una **enfermedad monogénica** y de **herencia recesiva**, por lo que la introducción de una única copia del gen hace posible la corrección del fenotipo.

- **Mosaicismo somático:** Como ya se ha mencionado, en el 10% de los pacientes con AF surgen mutaciones que revierten la mutación inicial o que permiten cierta expresión de la proteína [131, 132]. Estas células presentan una ventaja selectiva frente a los que no están revertidos genéticamente [74, 77]. De esto se deduce que la corrección artificial del defecto genético de una única CMH podría revertir el fenotipo hematológico. El mosaicismo somático sería, por tanto, un ejemplo de terapia génica natural [77, 133].

Así pues, la terapia génica en AF se apoya en la evidencia de la existencia de una ventaja selectiva que presentan las células corregidas, de modo que, transduciendo de manera estable un porcentaje relativamente bajo de CMHs con el gen terapéutico, podríamos corregir toda la población hematológica, ya que este gen se transmitiría a todos los linajes del sistema [134].

4. **Terapia génica en células reprogramadas.** Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*) son células indiferenciadas pluripotentes generadas a partir de células diferenciadas de pacientes mediante la técnica de reprogramación descrita por Yamanaka y col. [135]. Esta tecnología podría ayudar a superar la dificultad de encontrar hermanos genéticamente idénticos para el trasplante de células hematopoyéticas y a resolver el problema de aislar suficiente cantidad de CMHs para su manipulación genética *ex vivo* [136]. En apartados posteriores se discutirá ampliamente el estado de esta terapia, sus ventajas y los problemas que aún quedan por resolver.

3. MODELOS EXPERIMENTALES EN ANEMIA DE FANCONI.

3.1. Descripción de modelos animales existentes.

Los modelos de ratones representan una herramienta imprescindible para estudiar tanto los mecanismos que están implicados en el desarrollo de las patologías, como para desarrollar nuevas terapias. Uno de los métodos de generación de modelos animales para el estudio de una enfermedad se basa en la generación de ratones *knockout*, en los cuáles se deleciona por recombinación homóloga (HR) en células madre embrionarias (CMEs) parte del ADN del gen del que se quiere interrumpir su función. En la AF se han desarrollado diversos modelos animales deficientes en alguno de los genes implicado en la ruta de AF (Tabla 2).

Aunque la mayor parte de los modelos desarrollados muestran características típicas de la enfermedad tales como hipersensibilidad de las células a agentes entrecruzantes del ADN y en algunos casos a citoquinas como TNF α e IFN γ , no existe hasta la fecha ningún modelo de ratón de AF (con deficiencia en un único gen de la ruta AF) que reproduzca el fallo de la médula ósea observada en los pacientes. De hecho, sólo en el modelo de ratón de AF-P (ratón *Btbd12*^{-/-}) se observa una tendencia a desarrollar citopenias, manifestadas por una reducción de células blancas y plaquetas [137]. Con la intención de reproducir el FMO, y puesto que los ratones KO para uno de los genes de AF, se generaron ratones con doble deficiencia en genes de la ruta de Fanconi y sólo en el caso del modelo *Fancc*^{-/-}/*Sod1*^{-/-} (deficiente en el gen *Fancc* y el *Sod1* que codifica para la enzima superóxido dismutasa) [138] y *Fancc2*^{-/-}/*Aldh2*^{-/-} (deficiente en el gen *Fancc* y el *Aldh2* que codifica para la enzima aldehído deshidrogenasa mitocondrial 2) se desarrolló anemia aplásica. En este último modelo, en el

que además de estar delecionado el gen *Fand2* también se eliminó el gen *Aldh2* [139], se observó predisposición a desarrollar leucemia mieloide aguda (LMA), característica que no se había observado en ninguno de los modelos generados hasta el momento, aunque sí es cierto que en algunos de ellos tenían tendencia a desarrollar tumores.

Gen FA	Exon	Referencia	Principales Características
<i>Fancc</i>	8	[140]	Reducida fertilidad. Sin anomalías en el desarrollo ni hematológicas hasta los 9 meses. Las células del bazo tenían aumentado el número de aberraciones cromosómicas en respuesta a MMC y DEB.
<i>Fancc</i>	9	[141]	Fertilidad reducida en ratones. Sensibilidad a agentes entrecruzantes del ADN. PHs sensibles a INFγ. No se detecta anemia en SP, pero está reducida la capacidad de formación de colonias “ <i>in vitro</i> ” a partir de células de médula.
<i>Fanca</i>	4-7	[142, 143]	Fertilidad afectada e hipogonadismo. Fibroblastos con inestabilidad cromosómica espontánea e hipersensibles a MMC. Sensibilidad hematopoyética en PHs Ligera reducción de plaquetas y leve incremento de eritrocitos, pero no aparece anemia.
<i>Fanca</i>	1-6	[144]	Defectos en la fertilidad e incremento de apoptosis en la línea germinal. Con anomalías congénitas como crecimiento retardado y malformaciones craneales.
<i>Fancg</i>	2-9	[145]	Fertilidad reducida y supervivencia mendeliana. Linfocitos de bazo, progenitores de la MO y fibroblastos mostraron roturas cromosómicas espontáneas y son sensibles a MMC.
<i>Fancl</i>	4-14	[146]	Letalidad embrionaria. Peso reducido de los embriones al nacer.
<i>Fancf</i>	1	[147]	Fertilidad y supervivencia reducida. Hipersensibilidad a agentes entrecruzantes e incapacidad de monoubiquitar FANCD2. Incremento de la incidencia de tumores.
<i>Fancm</i>	2	[148]	Hipogonadismo. Hipersensibilidad a MMC en fibroblastos. Incremento de la incidencia de cáncer.
<i>Fandc2</i>	26-27	[149]	Fertilidad afectada por pérdida de la línea germinal. Letalidad perinatal. Sensibilidad celular a agentes entrecruzantes del ADN. Presentan microftalmia y cánceres epiteliales.
<i>Fandc1</i> (<i>Brca2</i> ^{27/Δ27})	27	[150]	Moderada reducción de la fertilidad y viabilidad perinatal. Hipersensibilidad a MMC. Proliferación de los progenitores <i>in vitro</i> afectada, menor capacidad de repoblación de CMHs a corto y largo plazo. Incremento de la incidencia de tumores y supervivencia reducida.
<i>Fancn</i>	Intrón 1	[151, 152]	Los embriones mutantes son más pequeños y tienen problemas en la diferenciación del mesodermo. Letalidad embrionaria. El fenotipo de estos ratones es, en general, muy similar al descrito para los ratones KO <i>Brca1</i> y <i>Brca2</i> , lo cual apoya la relación observada entre estas tres proteínas.
<i>Fanco</i>	2-3	[153]	Letalidad embrionaria cuando son <i>Rad51C-null</i> . Si no, muestran crecimiento y desarrollo normal. Los ratones que expresan el alelo hipomórfico son infértiles causado por defectos dimórficos en recombinación meiótica.
<i>Fancp</i> (<i>Slx4</i>)	3	[137]	Fertilidad reducida. Crecimiento reducido. Defectos en cerebro y microftalmia. Las células son senescentes prematuramente, inestabilidad cromosómica espontánea y son hipersensibles a agentes entrecruzantes del ADN. Tendencia a desarrollar citopenias sanguíneas (glóbulos blancos y plaquetas).
<i>Usp1</i>		[154]	Infertilidad masculina. Elevada letalidad perinatal. Hipersensibilidad a MMC e hipoplasia en MO.
<i>Fandc2/p53</i>		[155]	Incremento de la incidencia de tumores respecto al mutante simple. La supresión de p53 impide la parada de las células en fase S debido a estrés genotóxico.
<i>Fancc/Sod1</i>		[138]	Hepatocitos con producción incrementada de superóxido <i>in vitro</i> . Hipocelularidad en MO y descenso del número de leucocitos y eritrocitos en SP. El número de progenitores linaje positivo estaba reducido y el crecimiento clonogénico <i>in vitro</i> de colonias eritroides, mieloides y linfoides B tempranas comprometido.
<i>Fancc/p53</i>		[156]	Desarrollo de tumores más rápido que en los mutantes simples.
<i>Fandc2/Mlh1</i>		[157]	Crecimiento retardado. Sensibilidad a MMC.
<i>Fancc/Fancg</i>		[158]	Presenta anemia aplásica. Desarrolla LMA y SMD. Presenta anomalías cromosómicas.
<i>Fandc2/Aldh2</i>		[139]	Defectos en el desarrollo, predisposición a leucemia y son susceptibles los efectos tóxicos del etanol como fuente de aldehídos. Los individuos mayores que no desarrollan leucemia espontáneamente desarrollan anemia aplásica con daño acumulado dentro de la población de CMHs/PHs.

Tabla 2. Modelos animales de AF desarrollados hasta la fecha. MMC: Mitomicina C, INFγ: Interferón gamma, MO: Médula ósea, LMA: Leucemia Mieloide Aguda, SMD: Síndrome Mielodisplásico, CMHs: Células Madre hematopoyéticas, CMPs: Células Madre Progenitoras, CPH: Células Progenitoras hematopoyéticas, SP: Sangre periférica.

3.2. Generación de nuevos modelos de AF.

Como se ha observado, la generación de ratones mutados de AF basado en la eliminación de un único gen de AF no nos permite el estudio completo de las características de dicha enfermedad, ya que el problema hematológico es muy diferente al observado en humanos. Por ello, para el estudio

de la enfermedad hematológica, es necesario desarrollar nuevos modelos que mimeticen todas las características de la patología.

Una posible alternativa sería la **generación de modelos animales humanizados** fundamentados en el trasplante de ratones inmunodeficientes con CMHs de pacientes AF. Sin embargo, esta tarea presenta varias dificultades. La primera es que las muestras de CMHs de las que se dispone para investigación son reducidas. Como se ha mencionado anteriormente, la médula ósea de pacientes con AF contiene un bajo número de CMHs que además presentan una alta inestabilidad cromosómica, por lo que es muy complicado mantenerlas *in vitro* y tener un número adecuado para su trasplante en animales inmunodeficientes. Todo esto hace que dispongamos de muy pocas CMHs de pacientes de AF y que éstas no injerten en los modelos animales.

Una posible solución a este problema consistiría en la generación de células humanas que emulen el fenotipo de AF. Para conseguir este objetivo, un método adecuado puede ser el desarrollo de modelos en los que se disminuya la expresión de un gen de AF en CMHs humanas utilizando ARNs de interferencia. Este sistema presenta la ventaja añadida de que puede ser regulable, en el caso de que la disminución de la expresión del gen reprimido produzca la apoptosis de la célula.

Como hemos visto en la tabla 1, el grupo de complementación más frecuente en la AF es el A, representando, en nuestro país, hasta un 80% de los casos totales de pacientes de AF [33]. Por ello, sería útil desarrollar un modelo *knockdown* regulable del gen *FANCA* mediante el trasplante en ratones inmunodeficientes de células hematopoyéticas humanas interferidas para el gen *FANCA*.

Como es sabido, el trasplante de células humanas con fenotipo de AF debe ser realizado en ratones inmunodeficientes como los NOD/SCID o NOG. Los ratones NOD/SCID tienen severas deficiencias en la inmunidad innata y adaptativa, pérdida funcional de células B y T y baja actividad de las células NK [159]. Los ratones NOG (NOD/Shi-scid IL2^{rgnull}) no poseen ninguna actividad de las células T, B, ni de las NK. Aunque ambos modelos son adecuados para el trasplante de células humanas los ratones NOG han demostrado mayor eficacia que los NOD/SCID en el injerto de células humanas [160, 161]. Estos tipos de ratones inmunodeficientes permiten generar modelos de enfermedades y su estudio *in vivo* a largo plazo.

Otra posible alternativa para modelizar la enfermedad y estudiar el efecto de diversas terapias, como lo es la terapia génica, sería utilizando la recién desarrollada tecnología de las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). El uso de estas células junto con la terapia génica dirigida será explicado a lo largo de esta introducción ampliamente en apartados posteriores.

4. GENERACIÓN DE SISTEMAS *KNOCKDOWN*.

Como se ha mencionado previamente, los sistemas *knockdown* se utilizan para la inhibición o disminución de la expresión de un gen mediante ARNs de interferencia (ARNi_s). Para lograr una inhibición a nivel de ARN mensajero (ARNm) del gen diana se utilizan principalmente siARNs (del inglés *small interfering RNA*) y shARN (del inglés *short hairpin RNA*).

4.1. Sistemas de represión de la expresión génica: Biología de ARNi_s.

El proceso seguido por los ARN de interferencia (ARNi) fue observado por primera vez en células de las gónadas del nematodo *Caenorhabditis elegans* [162]. Este sistema de silenciamiento

génico fue estudiado en profundidad y se observó que ocurría de forma natural y común en la célula, la cual ha desarrollado mecanismos para defenderse contra las infecciones producidas por virus, de modo que, ante la presencia de un ARN de doble cadena (ARNdc) se activan complejos enzimáticos específicos que degradan y silencian la expresión del producto génico [163-167].

Los ARNi_s implicados en silenciamiento génico se han subdividido típicamente en tres clases diferentes dependiendo de su ruta de biogénesis, los ARNs pequeños de interferencia (siARNs), los microARNs (miARNs) y los ARNs asociados a PIWI (piARNs) [167]. Estos tres tipos de ARNs poseen diferentes funciones y estructura, sin embargo, aún no se conocen demasiado bien las diferencias existentes en sus rutas. De forma general, los tres tipos de ARNi_s son procesados mediante una ruta que se subdivide en tres pasos principales que consisten básicamente en la biogénesis de los pequeños ARNs para formar ARNi_s, su posterior carga en el complejo enzimático silenciador que mediará, en un último paso, el silenciamiento de ARNm de forma específica.

La posibilidad de silenciar un producto génico suscitó el interés de muchos investigadores, por lo que se comenzó a desarrollar una tecnología dirigida a la generación de moléculas de ARNi_s. Existen varios modos de generar moléculas de ARN de forma artificial para lograr el silenciamiento génico. Históricamente, el primer método descrito involucraba el uso de largos ARNbc_s (>30nt), aunque tenían el problema asociado de que disparaban la respuesta a interferón y, por tanto, la muerte celular en mamíferos [168]. Este problema fue solucionado gracias a la generación de ARNs de menor tamaño y doble cadena que se introducían directamente en el citoplasma. Aún así, este método no era del todo fisiológico, por lo que posteriormente se diseñaron horquillas pequeñas de ARN (shARN, del inglés *short hairpin RNA*) que eran introducidas en la célula a través de un plásmido o un vector viral en el cual se habían clonado previamente [169].

De forma general, los tres tipos de ARNi_s constituyen una herramienta eficaz para el silenciamiento génico, por lo que se han utilizado en múltiples investigaciones. Para que el efecto deseado de reducción de una diana génica tenga lugar con éxito deben controlarse ciertos parámetros para que no ocurran efectos indeseados. Entre estos factores que hay que tener en cuenta destacan la especificidad por la diana [170], la limitación de la maquinaria encargada del procesamiento de los ARNs cuando se quieren silenciar varios genes en el mismo organismo mediante el uso de distintos ARNi_s, y asegurarnos de que los ARNs introducidos ectópicamente en la célula no influyen en el procesamiento de los ARNs endógenos [171, 172].

A continuación se explicarán en detalle dos de los tipos de ARNs con más relevancia para nuestro trabajo.

4.1.1. Pequeños ARNs interferentes (siARN): Inhibición transitoria de la expresión de un gen.

Los siARNs son moléculas de ARN de doble cadena, con una secuencia de 20 a 21 nucleótidos [173]. Estas moléculas existen de forma natural en la célula, pero también pueden ser introducidas en ésta a través de diversos métodos, como por ejemplo la transfección o inyección [164]. Los siARNs endógenos se generan a partir de una ARN largo bicatenario (ARNbc) tras el procesamiento por parte de la enzima Dicer que pertenece a la familia de la ribonucleasa III [174, 175], mientras que los

siARNs introducidos exógenamente no requieren el procesamiento de Dicer y entran directamente en el complejo de silenciamiento. El segundo paso en el procesamiento del siARN, es, por tanto, la incorporación de estos siARNs al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*). Hasta este momento aún eran moléculas de ARNbc, pero aquí son desenrollados y, dependiendo de su estabilidad en 5', una de las cadenas será degradada mientras que la otra funcionará como guía para el posterior silenciamiento [176, 177]. En casi todos los casos, la cadena con más baja estabilidad 5' será utilizada como guía.

El último de los tres pasos principales es el silenciamiento específico del ARNm diana cuando éste es reconocido por el complejo RISC unido al siARN correspondiente (Fig. 2). Este proceso puede ocurrir por diferentes mecanismos como son el corte del ARNm, la represión a nivel de traducción y la degradación del ARNm [167]. El mecanismo por el que ocurre exactamente el silenciamiento no está dilucidado completamente, aunque se cree que tiene que ver con el tipo y grado de homología del siARN.

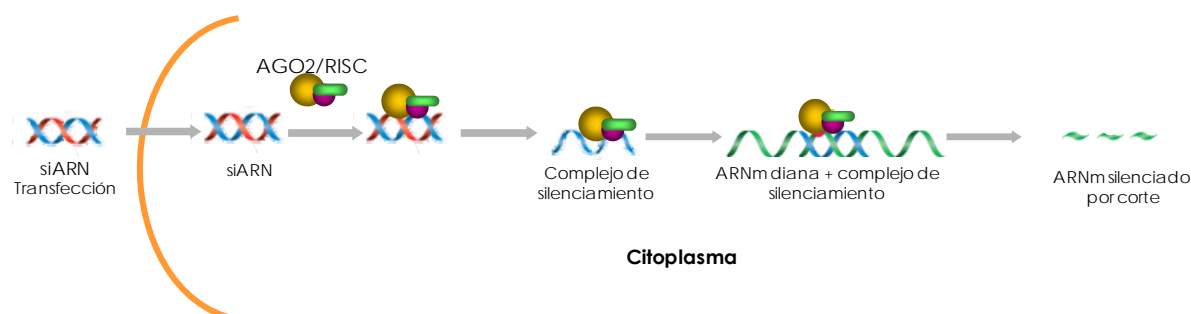


Figura 2. Dibujo esquemático del procesamiento de los siARN. El siARN es introducido en la célula mediante transfección como un ARNdc. En el citoplasma es reconocido por el complejo RISC, donde una de las dos hebras se degrada y finalmente este complejo se unirá específicamente al ARNm diana para silenciarlo.

La supresión de la expresión del gen mediada por siARNs ocurre de forma transitoria, ya que estos ARNs de interferencia se introducen directamente en la célula en forma de doble cadena, de modo que tras un tiempo de acción terminan por ser degradados en el citoplasma.

4.1.2. Horquillas pequeñas de ARNs (shARN): Inhibición estable de la expresión de un gen.

Como se ha mencionado anteriormente, la introducción de ARNs de más de 30 nucleótidos de longitud desencadenaría una respuesta a interferón fatal para la célula. Debido a esto se desarrollaron las horquillas pequeñas de ARN (shARN) que son capaces de desencadenar de forma endógena la respuesta a ARNi [178].

Las horquillas pequeñas de ARN (shARN) se utilizan para silenciar genes, para lo cual son diseñadas previamente para reconocer una diana específica y clonadas en plásmidos. Estos plásmidos pueden ser introducidos en la célula mediante transfección (plásmido desnudo) o a través de un vector viral (transducción). Se diferencian de los ARN pequeños de interferencia (siARN) en que pueden integrarse en el genoma del organismo si son introducidos a través de vectores integrativos y, por lo tanto, su expresión puede ser estable a lo largo del tiempo, mientras que los siARN que son transfectados terminan siendo degradados en el citoplasma y tienen, por lo tanto, una acción transitoria en la expresión génica.

Estos shARNs se caracterizan por poseer una estructura en la cual encontramos un pie o tallo formado por dos cadenas de ARN, de 21-29 NT, que se encuentran apareadas base a base y una región de bases que no aparean y que forman un bucle o “*loop*”. Esta estructura es procesada por la enzima Dicer [175], una ribonucleasa de la familia de las RNasa III que cataliza el primer paso del procesamiento de los shARN al cortar el bucle y convertir al shARN en un ARN corto de interferencia (siARN) dejando dos bases libres en los extremos 3’ hidroxilo y el extremo 5’ fosfato. Posteriormente, la doble cadena de siARN se une al complejo silenciador inducido por ARN (RISC), el cual degrada una de las cadenas de la estructura siARN, quedando únicamente una hebra de ARN monocatenaria que apareará con el ARNm de la secuencia diana, facilitando que el complejo RISC pueda ejercer su acción y degradar la diana (Fig. 3).

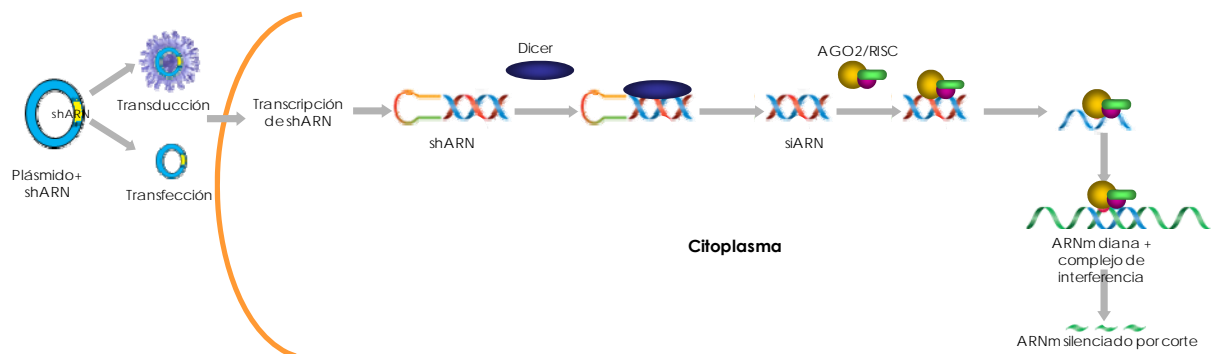


Figura 3. Dibujo esquemático del procesamiento de los shARN. El shARN penetra en la célula clonado en un plásmido que puede ser introducido por transfección o transducción mediante un vector viral. En el citoplasma el shARN es procesado por DICER que lo transforma en un siARN de doble cadena que se une al complejo RISC. Una de las dos hebras es degradada y se unirá específicamente al ARNm diana para silenciarlo.

Como promotores más específicos de los shARNs se han descrito los promotores de ARN polimerasa III (Pol III), especialmente los derivados del ARN pequeño nuclear (snARN) U6 y el promotor H1 [179, 180]

Los shARN pueden realizar su inhibición mediante su unión a:

- Regiones codificantes del ARN: La región del ARN transcrita a partir del ADN codificante (ADNc).
- Regiones no codificantes del ARN: Se diseñan frente a la secuencias UTR (*untranslated region*), que son regiones no codificantes del gen. Existen dos de estas regiones adyacentes al marco abierto de lectura (ORF) del gen, denominadas como 5'-UTR y 3'-UTR. A pesar de ser regiones no codificantes son muy importantes en la regulación de la expresión génica, además de estar implicadas en una adecuada expresión temporal y espacial de los genes. Hay que mencionar que la eficacia de los shARN dirigidos frente a las regiones UTR suele ser menor que la de los dirigidos frente a la región codificante.

La elección de uno u otro tipo de inhibición dependerá del objetivo que se quiera lograr en el trabajo, el grado de inhibición deseado y la accesibilidad de las distintas regiones.

4.2. Mecanismos para realizar la inhibición estable de la expresión de un gen utilizando vectores que portan shARNs.

Como se ha mencionado, la introducción de los shARNs en la célula a través de un vector integrativo permite la inserción estable de la secuencia codificante del shARN en el ADN celular, de

modo que pueden ejercer su función supresora en la célula durante un tiempo indefinido. La introducción de estos genes codificantes de shARNs se puede realizar a través de distintos tipos de vectores, entre los cuales destaca el uso de vectores virales de la familia *Retroviridae* cuyas características son explicadas posteriormente. Uno de los sistemas virales más utilizados en la actualidad para la inhibición estable de genes, ha sido la utilización de vectores lentivirales que expresan el shARN específico para la inhibición de un gen deseado.

A lo largo de este trabajo, se ha utilizado para la expresión del shARN un vector lentiviral descrito por el grupo del Dr. Trono [181, 182]. En este sistema el casete para la expresión del shARN está incorporado en la LTR 3' e incluye el promotor H1 que será el que dirige la expresión del shARN. La inclusión en el vector de un gen marcador, como la proteína verde fluorescente (eGFP, del inglés *enhancer green fluorescent protein*) -una proteína recombinante de 29 kDa- permite identificar las células que expresan el shARN, ya que ésta se coexpresaría con el gen marcador. En nuestro caso particular, la expresión del gen *eGFP* está dirigida por el promotor humano EF-1 α , y, además, este vector posee la secuencia Wpre (Elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota) que aumenta la estabilidad del ARNm producido y el operador TetO, cuya presencia es opcional y nos permitiría regular la expresión del shARN (Fig. 4).

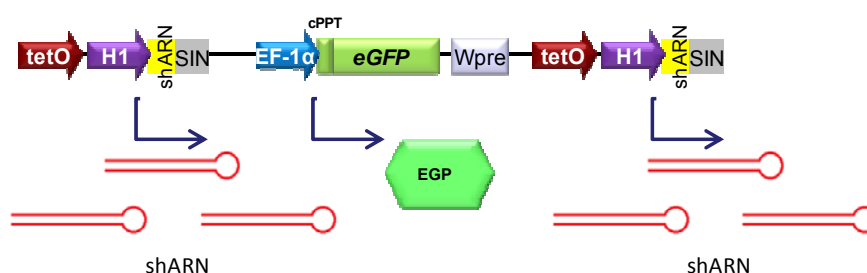


Figura 4. Esquema de un sistema no regulable de un vector lentiviral (provirus integrado) que contiene las secuencias de shARN. *TetO*: Operador de tetraciclina, H1: promotor inducible, *SIN*: self-inactivating (secuencias autoinactivantes), EF-1 α : promotor humano que dirige la expresión del transgén, cPPT: región rica en polipurina, Wpre: Elemento PRE (post-transcripcional regulatory element) de WHV (virus de la hepatitis B de la marmota –*Woodchuck hepatitis virus*–)

Los sistemas no regulables sólo se pueden utilizar cuando la inhibición del gen diana por parte del shARN no sea letal para la célula. Por ello, en muchas ocasiones debemos recurrir a sistemas de expresión regulable inducido por drogas. Un ejemplo de sistema regulable es el descrito por Trono y col. en el que se utiliza un vector denominado ET-KRAB en el cual la expresión del ARN de interferencia y del gen marcador (*eGFP*) será activado por doxiciclina [181, 182].

5. TERAPIA GÉNICA.

La terapia génica humana se define como una modalidad terapéutica mediante la cual se inserta, se elimina o se sustituye un determinado gen en las células de un paciente para corregir un defecto genético o para dotar a las células de una nueva función. Este tipo de terapia se puede llevar a cabo tanto *in vivo* como *ex vivo*. Las terapias *ex vivo* se basan en la capacidad para aislar células diferenciadas, progenitores o células madre de un paciente o un donante sano, expandirlas *ex vivo* y administrarlas al paciente para generar un injerto estable en el mismo. Una de las posibilidades que nos ofrece este tipo de terapias es el poder manipular las células *in vitro* para su corrección génica. Este tipo de terapias se han visto favorecidas respecto a las terapias *in vivo* [183, 184] porque los

protocolos para llevarlas a cabo son más eficaces y seguros debido a que no hay que exponer al paciente directamente al vector que contiene el transgén y además las células que se desea que sean dianas del vector pueden ser seleccionadas, expandidas y/o diferenciadas antes o después de que se realice la transferencia génica.

Algunas de las principales dianas celulares ya utilizadas en terapia génica *ex vivo* han sido:

- ✚ **CMHs.** Hasta el momento los mayores logros conseguidos en este tipo de terapia se ha conseguido utilizando células madre hematopoyéticas (CMHs) [185]. Así pues, la terapia génica con CMH autólogas supone, hoy día, una opción terapéutica viable para el tratamiento de las diferentes enfermedades monogénicas que afectan al sistema linfo-hematopoyético, o que afecta a otros tejidos pero que se pueden tratar por TG de CMHs, como es el caso de algunas enfermedades metabólicas de almacenamiento [186-190].
- ✚ **Células T.** Con el objetivo de ser utilizadas en inmunoterapia celular adoptiva y contra tumores, infecciones y enfermedades autoinmunes [191-194].
- ✚ **Otras células madre somáticas** como células madre epidérmicas o límbicas [195, 196], células madre o progenitores neurales [197, 198], células madre cardíacas [199] y células madre mesenquimales [200, 201].

5.1. Terapia Génica: Tipos.

Existen diversas estrategias de terapia génica con fines terapéuticos que pueden ser llevadas a cabo para modificar las células diana a tratar, una vez aisladas y crecidas *in vitro*. Dependiendo de las características de la enfermedad a tratar, se pueden utilizar las siguientes aproximaciones:

- ✚ **Adición génica:** Consiste en la introducción de una copia correcta del gen funcional para conseguir la expresión de la proteína deficiente en el paciente en un tejido específico. La expresión de la proteína debe alcanzar un nivel adecuado para restaurar el fenotipo sano en el paciente. Para integrar el gen deseado en el genoma de la célula diana, la práctica más extendida es hacerlo a través de un vector viral integrativo de modo que la integración ocurre al azar, si bien el transgén también se puede insertar en el genoma en sitios específicos mediante procesos de RH. Este gen insertado, además, se puede coexpresar junto con un gen marcador o de selección que permitirá la purificación celular, su expansión o la eliminación condicional de las células que no posean la nueva función.
- ✚ **Supresión génica:** En este caso se elimina (modelo *knockout*) o reduce (modelo *knockdown*), por ejemplo, utilizando ARNs de interferencia, la expresión de un determinado gen endógeno o exógeno [202]. Su aplicación es útil, por ejemplo en algunos tipos de cánceres, en los cuáles se sobreexpresan ciertas proteínas. Para conseguir el silenciamiento de genes también se han utilizado otras alternativas a la terapia génica como agentes químicos, transposones y nucleasas que introducen daño y mutaciones en el ADN de forma inespecífica [203-205]
- ✚ **Reparación génica:** Esta estrategia se basa en la sustitución completa o parcial del gen alterado por el gen correcto. La restauración del fenotipo se puede llevar a cabo o bien sustituyendo completamente el gen endógeno defectuoso por una copia funcional (generalmente ADNc) mediante recombinación homóloga, un proceso que de forma natural ocurre con baja eficiencia en las células; o bien mediante el intercambio de los nucleótidos mutados de la secuencia del

gen por los nucleótidos correctos para así generar una copia funcional del gen. Esta última aproximación sólo es útil para la corrección de enfermedades monogénicas, en las cuáles la enfermedad es causada por mutaciones puntuales en un único gen.

5.1.1. Factores relevantes para el desarrollo de protocolos de terapia génica.

Los factores que hay que tener en cuenta para realizar terapia génica son los siguientes:

1. **La elección del vector:** En enfermedades como la AF, uno de los factores a tener en cuenta cuando se realiza terapia génica es el de encontrar un sistema adecuado para introducir el ADN en las células diana y que éste se exprese de forma estable a lo largo del tiempo. Actualmente los vectores más utilizados son derivados de γ -retrovirus, lentivirus, virus *foamy* del grupo de los spumavirus y α -retrovirus. Aunque en un principio se pensaba que estos vectores se integraban al azar en el genoma, cada vez más estudios revelan la preferencia de ciertas zonas genómicas en función del tipo de virus [206]. En la tabla 3 se describen brevemente los principales sistemas virales y las ventajas e inconvenientes que cada uno de ellos tiene.

Sistema Viral	Ac. Nucleico	Expresión	Pseudotipado	Infectan células en...	Capacidad (transgén)	Título (virus/mL)	Inserción	Inmunogenicidad
Gammaretrovirus (RV) [207, 208]	ARN	Estable	SI	Mitosis	<8kb	10^6 - 10^7	En unidades de transcripción (cerca de promotores)	NO
Lentivirus (VL) [209-212]	ARN	Estable	SI	Mitosis/ Quiescentes	<10kb	10^6 - 10^7	A lo largo de la unidad transcripcional	NO
Espumavirus	ADN	Estable	SI	Mitosis/ Quiescentes	<10kb	10^6 - 10^7	Es islas CpG	NO
Virus adeno asociados (AAVs)	ADN	Estable	NO serotipos	Mitosis/ Quiescentes	<5kb	10^{12}	NO	NO
Adenovirus (AdV)	ADN	Transitoria	NO	Mitosis/ Quiescentes	<32 kb	10^{14}	Preferencia cr. 19	SI
Virus Herpes Simplex	ADN	Transitoria	NO	Mitosis/ Quiescentes	30 kb	10^4 - 10^8	NO	NO

Tabla 3. Principales sistemas virales utilizados en terapia génica. Se muestran las principales características de los sistemas virales utilizados con mayor frecuencia en protocolos de terapia génica. Hay que tener en cuenta que en los virus pseudotipados con la envuelta VSV-G susceptible de ultracentrifugación se pueden alcanzar títulos de 10^{10} - 10^{12} virus/mL.

Puesto que los vectores de la familia *Retroviridae* han sido los más utilizados en terapia génica para la expresión estable de un determinado transgén, y han sido utilizados por nosotros a lo largo de todo este trabajo, vamos a explicar un poco más en profundidad sus características. Los virus pertenecientes a esta familia se caracterizan por poseer como material genético ARN de cadena simple de polaridad positiva que, por medio de la transcriptasa reversa, se convierte en ADN de doble cadena y mediante una integrasa se integra en el ADN genómico de la célula hospedadora en forma de provirus. Los géneros más utilizados para este fin son:

- **Vectores gammaretrovirales (RV):** Estos vectores han sido ampliamente desarrollados para su utilización en protocolos de terapia génica. Sin embargo, presentan varios inconvenientes como son el que no pueden infectar células en estado quiescente y que presentan riesgo de oncogénesis insercional por transactivación génica próxima al sitio de la integración [213, 214].
- **Vectores lentivirales (VL):** El representante más conocido de los lentivirus es el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) por ser el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Su principal ventaja frente a los RV es que pueden infectar tanto células en

división como las que están en estado quiescente, debido a que su complejo de preintegración puede atravesar la membrana nuclear de la célula diana a través del nucleoporo [215, 216]. De este modo son más eficaces que los RV para la transducción de CMH, ya que en condiciones fisiológicas las CMHs de un individuo sano se encuentran en estado quiescente, por lo que no se requiere una prolongada pre-estimulación *ex-vivo* de las células, lo cual comprometería su multipotencia [217-219]. Además se ha demostrado que estos vectores lentivirales son más seguros clínicamente, pues tienen menos riesgo de producir oncogénesis insercional [220-223] ya que no tienen preferencia por integrarse en el sitio de inicio de la transcripción. Otra forma de aumentar la seguridad se ha conseguido inactivando las LTRs y utilizando promotores internos de expresión adecuada [224].

Los retrovirus poseen fundamentalmente tres genes esenciales (Fig. 5):

- **El gen gag:** Codifica las proteínas estructurales del virión (matriz, cápside y nucleocápside).
- **El gen pol:** Codifica las enzimas virales (proteasa, transcriptasa reversa e integrasa).
- **El gen env:** Codifica la glicoproteína viral de la envuelta, formada por las subunidades de superficie y transmembrana.

También presentan una serie de regiones importantes, tales como la región R, U5, sitio de unión del iniciador (*Primer Binding Site*, PBS), Ψ , región Leader, fragmento de polipurinas (*Polypurine Tract*, PPT) y U3.

Los lentivirus son genéticamente más complejos y poseen seis genes auxiliares: Tat, Rev, Vpr, Vpu, Nef y Vif, de los cuales sólo Tat (estimula la transcripción del genoma viral) y Rev (facilita la exportación al citoplasma de los ARNm virales) son esenciales para la expresión de los genes virales y pueden aportarse en posición *trans*, aunque los VL de tercera generación utilizados actualmente son independientes de Tat. El resto serían esenciales para la replicación del virus en el animal hospedador.

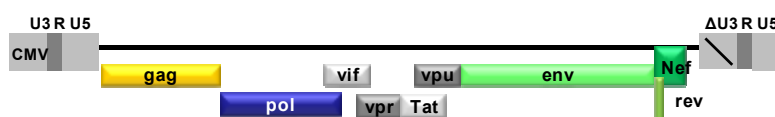


Figura 5. Organización genética del provirus lentiviral integrado con la LTRs generadas.

Hasta el momento no se han podido producir de manera eficaz líneas empaquetadoras estables de VL debido a la elevada toxicidad de la envuelta VSV-G, la más utilizada, y de alguna de las proteínas auxiliares de los VL [213, 225, 226]. Por ello, la información genética para la producción de sobrenadantes (SN) lentivirales es aportada por tres plásmidos (SN de segunda generación) o por cuatro (SN de tercera generación) que serán los que nosotros utilicemos en el presente trabajo [227, 228]. Estos plásmidos poseen las siguientes características:

- **Plásmido de transferencia:** Genera un vector autoinactivante en el que se han eliminado todas las secuencias esenciales para la integración que se pueden suministrar en *trans* incluidas en el plásmido empaquetador. Además se ha delecionado una secuencia de 400

pares de bases (pb) en la región U3 de la LTR3'. Todo esto hace que el provirus (integrado) pierda la capacidad de generar partículas replicativas competentes [209, 228]. Además, la expresión del transgén no está dirigida por las LTRs, sino por un promotor interno como el del citomegalovirus (CMV) o por un promotor humano como el de la fosfoglicerato quinasa (*Phosphoglycerate kinase*, PGK).

- **Plásmidos empaquetadores:** Contienen, únicamente, tres de los nueve genes existentes en el genoma del virus parental (gag, pol y rev). En nuestro caso utilizaremos plásmidos de tercera generación en donde se utilizan dos plásmidos empaquetadores para aumentar la seguridad, uno de ellos con el gen *rev* y otro con los genes *gag-pol*.
- **Plásmido de la envuelta:** Permiten la generación de VL pseudotipados, utilizando una envuelta distinta a la propia del virus para modificar su tropismo. La glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G, del inglés *Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G*) [229, 230] es la proteína más utilizada para empaquetar lentivirus, ya que al entrar en la células a través de poros se facilita la transducción de forma eficiente de células de varias especies, entre las cuales se incluye la humana [219].

Las estrategias de terapia génica integrativa basadas en virus para integrar de forma eficiente un gen exógeno en el genoma humano [6] tienen como inconveniente principal que la inserción del ADN exógeno en zonas del genoma pueden interrumpir o modificar la expresión de ciertos genes endógenos, causando un fenotipo anómalo por mutagénesis insercional. Este hecho, en el caso de terapia en humanos, ha supuesto un problema de seguridad más acuciado en el caso de la utilización de retrovirus, pero que parece estar muy limitado si utilizamos VLs [231]. Por ello, además de los vectores virales recién descritos, existen otras vías para introducir genes en el genoma celular como son la transfección con plásmidos de ADN, transposones como el *Sleeping Beauty* (SB) [232, 233], episomas replicativos o casetes de intercambio mediados por recombinasa (del inglés *recombinase-mediated cassette*) [234, 235]. La elección de un sistema integrativo o no, va a depender, en gran medida, del tejido que se quiera transducir o transfectar. Por ejemplo, se ha observado que en tejidos relativamente quiescentes como cerebro, corazón o músculo, los vectores episomales pueden permanecer activos durante toda la vida de un ratón [236]. Sin embargo, para tejidos como el hematopoyético, donde existe un alto recambio celular, es mejor utilizar vectores que permitan la integración estable del ADN exógeno en el genoma.

2. **Eficiencia de la transferencia génica:** Es un factor de vital importancia, ya que puede limitar la obtención de resultados positivos en las aplicaciones terapéuticas.
3. **Genotoxicidad insercional:** Es un factor muy importante a tener en cuenta a la hora de elegir el tipo de vector, por ello numerosos estudios recientes han comparado el efecto producido por los diferentes vectores tras transducir CMHs de ratón y humanas, estudiando los eventos celulares de transformación, de modo que nos permiten conocer mejor el riesgo genotóxico producido por los diferentes vectores [237-239]. Las inserciones más peligrosas son aquellas que generan mutaciones de ganancia de función como la activación de protooncogenes que se encuentran flanqueando el sitio de inserción. Esto es debido a los elementos potenciadores (*enhancers*) y promotores que hay en el vector, o por un *splicing* aberrante del transcrito del vector [240, 241].

En la familia de los retrovirus existen estas señales por lo que estos eventos ocurren con mayor frecuencia ya que tienden a integrarse en unidades de transcripción; sin embargo, hay que diferenciar entre los distintos géneros de virus dentro de esta familia, ya que mientras que los γ -retrovirus tienen tendencia a integrarse cerca de promotores de genes activos, los lentivirus lo hacen a lo largo de toda la secuencia [208, 242]. Por ello, en vectores integrativos, como los γ -retrovirus y lentivirus, se han incluido mejoras tales como la inactivación de las de repeticiones largas terminales (LTRs, del inglés *long terminal repeats*), el uso de promotores internos con la actividad o especificidad celular deseada para dirigir la expresión del transgén, y finalmente la adición en el esqueleto del vector de elementos cromatídicos como los aisladores (del inglés, *insulators*) que controlen la expresión del transgén y protejan a los genes adyacentes al vector de la influencia de éste.

4. **Expresión competitiva del transgén y regulación:** Es importante tener en cuenta la duración de la expresión del transgén ya que ésta debe de ser suficiente para tratar la patología en cuestión. La variación en la expresión del transgén puede ser debida a varias causas. Una de ellas depende de la naturaleza del vector y del sitio de integración de éste, ya que en función de ello, se producirán diferentes modificaciones epigenéticas en el genoma del vector que pueden impedir totalmente la expresión del transgén. Así por ejemplo, los γ -retrovirus tienden a silenciarse debido a la metilación en las LTRs, mientras que los vectores lentivirales autoinactivantes, con las LTRs modificadas, tienden a expresarse más establemente [243]. Otro factor a tener en cuenta es la elección del promotor, dependiendo de si queremos que el transgén se exprese de forma ubicua (se utilizarán promotores como el del gen fosfoglicerato quinasa, la ubiquitina o el factor de elongación 1 α) o bien lo haga de forma específica en un tejido o tiempo determinado. El nivel de expresión también se ve afectado por el estado de diferenciación celular, ya que dependiendo de las marcas epigenéticas y la remodelación de la cromatina, la estabilidad de la expresión puede verse alterada. Actualmente se han diseñado estrategias dirigidas a controlar la expresión de los transgenes en determinados estadios de la célula (diferencian entre células madre o progenitores y células maduras) o entre diferentes linajes, incluyendo para ello en los vectores promotores específicos o las dianas de microARNs que se expresan diferencialmente en los distintos tipos celulares, de modo que la expresión sea inhibida en ciertos estadios o tipos celulares y no en otros [244, 245].
5. **Respuesta inmune del huésped:** Una de las barreras que se pueden presentar a la hora de aplicar un protocolo de terapia génica es la activación de la respuesta inmune del huésped frente al producto del transgén o a las envueltas virales. Aunque se está estudiando mucho al respecto [246-250], una de las mayores dificultades es que actualmente no es posible predecir la respuesta innata y antígeno dependiente de humanos a través de estudios que se realizan en modelos animales.

5.2. Terapia Génica Dirigida.

La ingeniería genética dirigida o *gene targeting* permite interrumpir, insertar o reemplazar una secuencia del genoma en un determinado locus de forma específica. Como ya se ha mencionado

brevemente en el apartado anterior, para manipular específicamente un gen se pueden seguir dos tipos de estrategias basadas principalmente en mecanismos de recombinación homóloga (RH):

- Una primera estrategia, denominada **corrección genética**, consistiría en hacer cambios genéticos directos sobre el gen diana alterado responsable de la patología y se basaría en la sustitución dirigida del gen completo por la variante sana o bien en la sustitución de las regiones nucleótídicas que se encuentran mutadas.
- Una segunda alternativa, englobada bajo el nombre de **adición génica dirigida**, tiene por objeto la inserción de una variante “sana” del gen alterado en un sitio del genoma diferente al lugar que ocupa el gen alterado, es decir, en un sitio seguro del genoma o un desierto génico.

La modificación de un gen de forma específica en el genoma supone una ardua tarea, sobre todo en sistemas eucariotas. Como se ha mencionado, es necesaria la intervención de mecanismos de recombinación homóloga para modificar el genoma en un sitio específico. Sin embargo, de forma fisiológica, la tasa de RH ocurre con una frecuencia tan baja (una de cada 10^4 - 10^7 células), que incluso en organismos como los ratones -en los que la sustitución de un gen es una práctica habitual gracias a la facilidad que presenta la manipulación y selección de células madre embrionarias en cultivo [251]- es necesario la aplicación de sistemas de selección de las células en las que ha ocurrido la modificación genética deseada. Debido a esto, la realización de terapia génica dirigida en células humanas presenta varios problemas que tienen que ser solucionados para aumentar el porcentaje de éxito. Entre estos inconvenientes destacan la baja tasa de RH, la dificultad de llevar a cabo procesos de selección y las limitaciones para trabajar con células madre embrionarias (CMEs) en las que llevar a cabo la corrección genética. Debido a esto, durante los últimos años, una parte importante de la investigación enfocada al aumento de la eficiencia de la terapia génica se basa en la búsqueda de estrategias que aumenten la tasa de RH y de nuevas fuentes celulares que nos permitan su manipulación *in vitro*. El conjunto de estas técnicas cobran especial importancia en el caso del tratamiento de enfermedades monogénicas causadas por la herencia de un único gen defectuoso [252].

5.2.1. Mecanismos implicados en la reparación de dobles roturas del ADN y su relevancia en terapia génica.

Hasta el momento, los únicos mecanismos que parecen haber tenido efecto sobre la RH han sido aquellos que generaban daño en el ADN. Las primeras evidencias de este efecto se obtuvieron tras la realización de experimentos en los que agentes que inducían daño en el ADN estimulaban el intercambio homólogo entre cromátidas hermanas [253]. Así pues, basados en estos hechos y en el descubrimiento de que la recombinación natural en levaduras se iniciaba por roturas de doble cadena (DSBs, del inglés *double strand breaks*), se llevaron a cabo experimentos en los que se demostró que las DSB incrementaban drásticamente la frecuencia de la recombinación local, tanto en levaduras [254, 255] como en células de mamíferos [256, 257] y se observó que la RH con un donador de ADN homólogo se estimulaba en varios órdenes de magnitud.

Así pues, para poder llevar a cabo técnicas de ingeniería genética dirigida es necesaria la generación de DSBs en los lugares deseados ya que aumentan la eficacia de RH. Las DSBs

cromosómicas pueden generarse tanto debido a fuentes endógenas como exógenas. De forma natural, las DSBs, se producen espontáneamente durante la síntesis de ADN cuando la horquilla de replicación se encuentra con un molde de ADN dañado y durante ciertos procesos celulares especializados. De forma exógena se pueden inducir exponiendo las células a radiación ionizante, luz ultravioleta (UV), inhibidores de la topoisomerasa, drogas radiomiméticas y si se quieren inducir en regiones específicas del ADN es posible hacerlo mediante el uso de nucleasas de diseño. Las DSBs son una grave amenaza para la integridad de la información genética de una célula, ya que su incorrecta reparación resulta en modificaciones no deseadas del genoma o la pérdida de grandes fragmentos de ADN [258] que pueden promover carcinogénesis y acelerar el envejecimiento. Por ello, los sistemas eucariotas han desarrollado diferentes mecanismos que reparan eficientemente las DSBs. Entre estas vías de reparación caben destacar NHEJ y RH [259]. De forma artificial, la generación de DSBs en lugares específicos del genoma utilizando nucleasas inducen estas dos vías de reparación, mecanismos que han sido explotados por los investigadores para el desarrollo de la ingeniería genética dirigida.

■ Reparación por unión de extremos no homólogos: NHEJ.

Se trata de un método rápido y eficiente de reparación de DSBs que implica la ligación de los dos extremos de ADN formados tras la DSB [260] y representa la ruta predominante de reparación de DSBs en mamíferos, ocurriendo en una relación de 1000:1 frente a la RH [261]. Esta ruta de reparación se utiliza durante todo el ciclo celular, pero es más relevante durante las fases G₀-G₁ y fase S temprana [262, 263]. La maquinaria proteica de la ruta canónica de NHEJ permite que los extremos de ADN se encuentren próximos facilitando que los dos extremos se ligan enzimáticamente para completar el proceso de reparación. De forma resumida, el complejo proteico herodimérico Ku70/Ku80 se une con alta afinidad al extremo del ADN [264, 265] y recluta la PKcs-ADN (subunidad catalítica proteína quinasa dependiente de ADN) y activa su función quinasa [266]. Esta proteína junto con la proteína Artemis puede estimular el procesamiento de los extremos de ADN [267]. Finalmente, el complejo XRCC4-ADN ligasa IV, aunque no forma un complejo estable con el ADN interactúa de forma estable con el complejo ADN-Ku y lleva a cabo el paso de ligación para completar la reparación del ADN [268] (Fig. 6).

A pesar de ser un mecanismo de reparación eficaz, el NHEJ innato no utiliza la secuencia homóloga para restaurar la DSBs, por lo que, con frecuencia se introducen errores consistentes en deleciones o inserciones de nucleótidos (indels). Este hecho hace que cuando se induce una DSB mediante el uso de nucleasas se pueden generar *indels* que alteren el marco de lectura del gen diana y, por tanto, den lugar a una proteína truncada [269].

A continuación pasaremos a describir las aplicaciones que tiene la reparación por NHEJ de las DSBs inducidas por nucleasas:

- 1) Eliminación de genes o generación de *knockouts*: El uso más amplio que se le ha dado al mecanismo de NHEJ en ingeniería genética ha sido la generación de *knockout* de un gen diana (interrupción de dicho gen). Aunque también se pueden eliminar genes por RH, presenta varias ventajas cuando se realiza por NHEJ, tales como:
 - En eucariotas la reparación por NHEJ ocurre con una frecuencia mucho mayor que la RH.

- La reparación por NHEJ introduce *indels* en el sitio de corte de las nucleasas que con frecuencia destruyen la función del gen de forma directa.
- Al contrario de lo que ocurre en el caso de la RH no se necesita introducir simultáneamente un vector donador de ADN junto con las nucleasas para eliminar un gen, por lo que la eficacia de eliminación de la función génica es mayor y el proceso más sencillo cuando se utiliza la vía de NHEJ.

La supresión de genes utilizando nucleasas se ha realizado con éxito en múltiples modelos animales y células de mamíferos. Por ejemplo, la inyección directa de ARNm que codifica dedos de Zinc (del inglés, *Zinc Finger nucleases*, ZFNs) en embriones de una única célula se ha establecido como una herramienta eficiente y rápida para generar modelos animales KO para un gen [204]. Este mecanismo ha sido utilizado con éxito en *Drosophila*, pez cebra, rata y modelos animales para enfermedades humanas [270-277]. Puesto que los ZFN se dirigen a

un embrión de una única célula que generará un organismo completo, se puede esperar una alta tasa de eliminación del gen diana tanto en las células somáticas como en las células de la línea germinal que sean hijas directamente de esta célula KO, en comparación con los métodos tradicionales de generación de modelos animales KO.

La aplicación más frecuente, en cultivos celulares de mamíferos, consistente en la eliminación de los genes mediada por NHEJ se ha llevado a cabo mediante la expresión transitoria de ZFNs a través de diferentes mecanismos tales como la transfección química, la electroporación, el uso de vectores lentivirales deficientes en integración o ARN para la expresión de los ZFN [205, 278, 279]. La frecuencia de generar un KO utilizando esta aproximación va desde el 1 al 50%, lo que, en algunas ocasiones, elimina la necesidad de seleccionar las células con la correcta manipulación genética mediante el uso de drogas.

- 2) Eliminación y reordenamientos de fragmentos cromosómicos: Cuando se inducen dos DSBs simultáneas la reparación por NHEJ pueden conducir a la eliminación de un fragmento

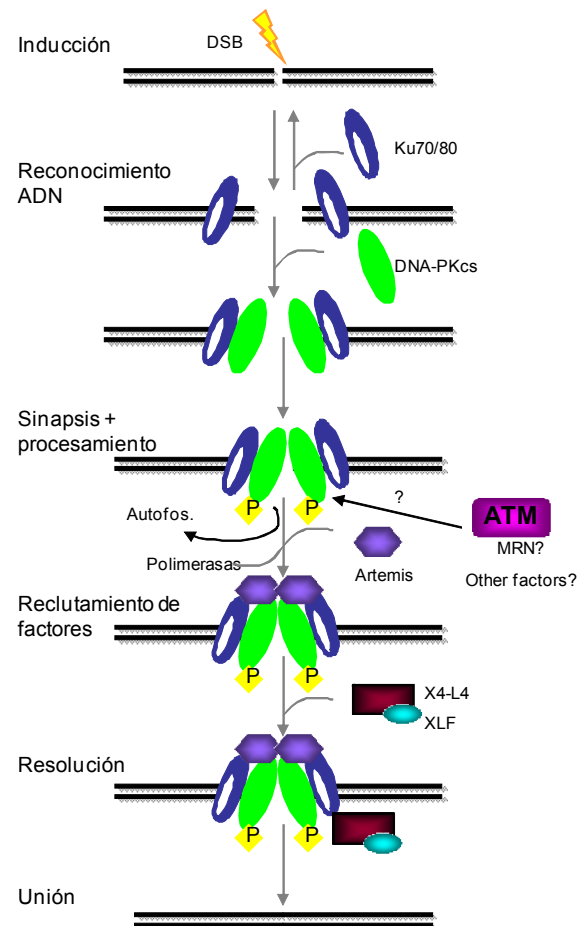


Figura 6. Ruta de NHEJ en células de mamíferos. El heterodímero de Ku une los extremos de ADN formados tras una DSB y los acerca, permitiendo el reclutamiento de ADN-PKcs en los extremos. La sinapsis de ADN-PKcs dispara su fosforilación, alterando su conformación, lo que permite el reclutamiento de Artemis y de otros factores como la ADN polimerasa X. Tras el procesamiento de los extremos, el complejo X4-L4 junto con XLF ligará los extremos y reparará la rotura.

cromosómico (las dos roturas ocurren en el mismo cromosoma) o a una translocación (las dos roturas se producen en diferentes cromosomas) [280-283]

- 3) Introducción de pequeños fragmentos de ADN en el genoma: Consiste en la introducción de fragmentos pequeños de ADN con extremos salientes generados adecuadamente para que cuando sean introducidos en una célula junto con los ZFN éstos se integren en el sitio de la DSB [284].
- 4) Compensación de información genética: Aún no se ha utilizado ampliamente en modelos de investigación pero se ha observado que los ZFNs pueden ser utilizados para conseguir un rango de variaciones genómicas que permitan comparar genomas a nivel de investigación.

■ **Recombinación homóloga (RH).**

La recombinación homóloga (RH) es uno de los mecanismos de reparación que se enmarcan dentro de la reparación por homología directa (RHD) junto con el SSA (del inglés, *single-strand annealing*) y BIR (el inglés, *break-induced replication*) pero, mientras que estos dos últimos mecanismos son mutagénicos, la RH es una reparación conservativa de las DSB. A diferencia del NHEJ, la reparación de dobles roturas mediada por RH implica el uso de un molde de ADN con homología [285].

De forma muy resumida, el mecanismo de RH entre secuencias homólogas se inicia con la unión del complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) al ADN seguida de la unión de CtPI, actuando posteriormente la exonucleasa humana I (hExo1) que se encarga de la resección de los extremos de ADN en dirección 5'→3' para producir extremos 3' salientes de ADN de cadena sencilla. Estos extremos quedan expuestos para su unión con la proteína de replicación A (RPA) antes de que Rad51 comience la búsqueda de homología. Cuando una secuencia homóloga es detectada se produce el proceso de RH a través de la formación y resolución de una unión Holliday [286] (Fig. 7).

Antes de la existencia de la tecnología de las nucleasas ya se utilizaba la RH para introducir un fragmento de ADN en un sitio específico del genoma. Sin embargo, este proceso es altamente ineficiente, excepto en levaduras y células madre embrionarias de ratón. La introducción de DSBs en un sitio específico del genoma aumentó de 100 a 10.000 veces la frecuencia de integración de ADN en un gen diana determinado [287]. Debido a esto el uso de nucleasas de diseño, como los ZFNs, son una herramienta perfecta para la generación de DSBs y la corrección específica del genoma cuando éstas son reparadas por RH favorecida gracias a la introducción adicional de un ADN molde junto con los ZFNs en la célula.

Algunas de las aplicaciones más interesantes de la RH como vía de reparación de las DSBs inducidas por ZFNs son:

- 1) Eliminación de genes (KO): Consiste en la interrupción del gen con una secuencia exógena que normalmente porta un gen de selección, lo cual permite la identificación y aislamiento de las células en las que se ha producido la alteración deseada en el gen.
- 2) Adición génica dirigida y reparación génica: Debido a que el material genético se introduce de forma fidedigna en el sitio deseado, se ha utilizado esta estrategia para la adición y la corrección génica dirigida, tanto en células diferenciadas humanas en cultivo [288], como en células madre

embrionarias y células pluripotentes inducidas [289, 290]. La terapia génica dirigida vía RH se ha establecido como una herramienta clave para modificar de forma específica el genoma de distintos organismos [251, 291]. Para que este proceso ocurra se precisa la presencia de un ADN donador que contenga secuencias de ADN homólogas a la secuencia diana y que, tras su introducción en la célula, permita que haya un intercambio de información genética entre la secuencia diana y la introducida ectópicamente [292]. A pesar de que teóricamente esta estrategia parece perfecta, la técnica está limitada al sistema en el que se quiera realizar la RH, ya que es necesario que el ADN sea introducido de forma propicia en la célula y que el proceso de RH entre el ADN del donador y la diana endógena ocurra con alta frecuencia, lo que se consigue generando DSBs en la célula [287]. Mediante esta técnica se ha conseguido introducir hasta 8 kb de ADN exógeno en regiones específicas del genoma [293].

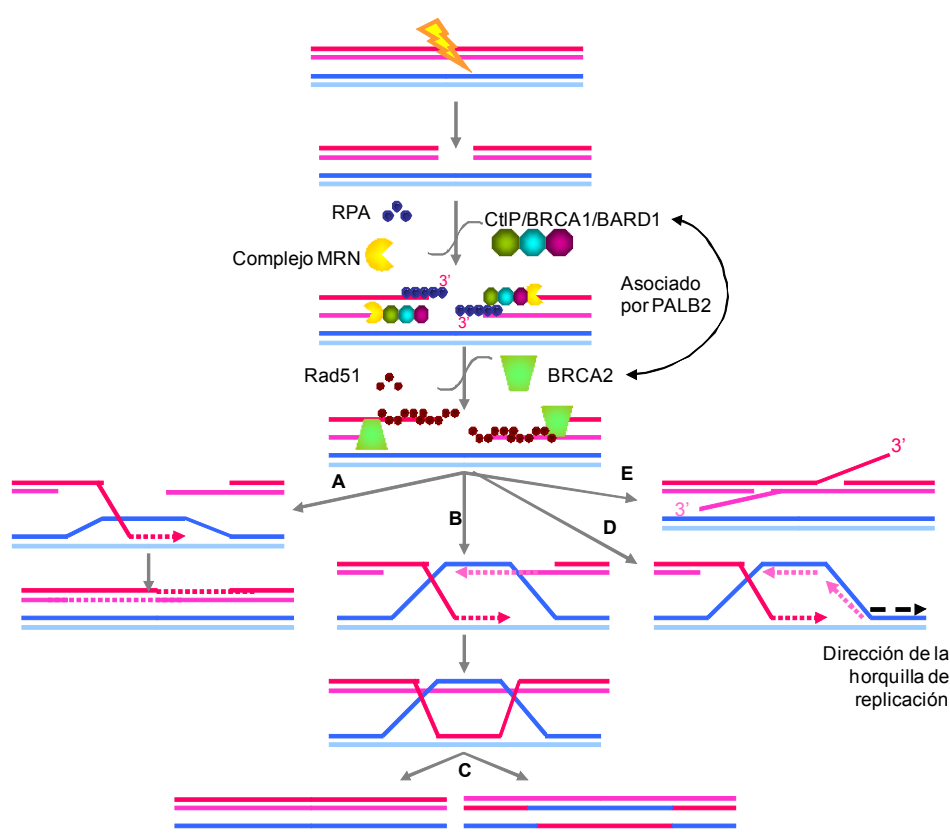


Figura 7. Ruta RH en eucariotas. Tras la DSB el complejo MRN junta los extremos de ADN y en cooperación con el complejo CtIP–BRCA1–BARD1 ayuda a la resección de los extremos. El ADNmc se une a la proteína RPA que evita la formación de estructuras secundarias y BRCA1/BARD1 promueven la acumulación de BRCA2 vía PALB2. BRCA2 cataliza la nucleación de Rad51 en el extremo libre 5' y una vez formados los filamentos de Rad51, captura el dúplex de ADN y busca la homología. La reparación puede ocurrir por varias vías. A) SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*). B) Modelo DSB (double-strand break repair) mediado por la formación de dos uniones Holliday (HJ). C) La estructura doble de HJ se resuelve para producir productos con y sin entrecruzamiento. D) Ruta SSA (*single strand annealing*). E) Modelo BIR (*Break induced replication*).

5.2.2. Herramientas utilizadas en la modificación del genoma.

Existen varias estrategias que pueden ser utilizadas para alterar los genes de los mamíferos a través de las rutas de reparación del ADN. Estos se dividen en cinco categorías que se detallarán brevemente en la tabla abajo descrita (Tabla 4).

Método	ssODNs	SDF	TFO	AAV	Nucleasas (ZFN)
¿Qué son?	Secuencia de ADN de cadena sencilla complementaria a la diana excepto en un nucleótido central [294, 295]	Pequeños fragmentos de ADN de entre 400 y 1000 pb que son homólogos a la secuencia diana [296, 297]	Secuencias cortas de oligonucleótidos (10-50 pb) de ADN o ARN que se unen al arco mayor del ADN de doble cadena [298].	Virus icosaédricos con un genoma de ADNcs de 4,7 kb que codifica para los genes <i>rep</i> y <i>cap</i> (encapsidación y replicación vírica). Estos genes están flanqueados por dos ITRs (repeticiones terminales invertidas) [299] y son reemplazados por la secuencia homóloga a la secuencia diana.	Moléculas formadas por un secuencia de reconocimiento del ADN y un dominio enzimático capaz de generar DSBs
Rutas de reparación involucradas	NER, BER, RHD? (MMR y NHEJ son supresoras) [300, 301]	SFHR	NER, NHEJ? MMR? RHD? [302, 303]	RHD, NHEJ [304]	RHD, NHEJ
Eficiencia de corrección	0,1-5% (células somáticas) ~0,1% (CMEs)	0,2-20% (células somáticas) 0,025% (CMEs) [305]	0,1-1,5% (células somáticas)	9,86%-65% (células somáticas) y ~0,07-1% (CMEs e iPSCs) [306-308]	~18-30% (células somáticas) 0,15-5% (iPSCs + CMEs)
Ventajas	Síntesis sencilla, estable, resultados reproducibles.	Resultados reproducibles, reparación episomal potente, los artefactos pueden ser eludidos.	Síntesis sencilla, toxicidad baja, específico de diana, funcional en CPHs humanas, formación estable del complejo-diana	Alta eficiencia y fidelidad, efectivo <i>in vivo</i> , amplio rango de células diana, baja patogenicidad	Alta eficiencia, mecanismo de reparación conocido, perfil de ciclo celular normal, baja tasa de integraciones, muy útil en silenciamiento de genes diana
Desventajas	Mecanismo desconocido de reparación, tamaño de secuencia limitado, artefactos de la PCR, genotoxicidad, dependencia de la replicación celular.	Mecanismo SFHR desconocido, síntesis (PCR) y puede introducir mutaciones indeseadas en el gen diana.	Mecanismo de reparación desconocido, restringido a dianas de homopurinas, secuencias ricas G-C, débil unión al ADN, muerte celular.	Problemas de seguridad, tamaño limitado de integración del ADN exógeno, alta tasa de integraciones al azar [309-311], muerte celular.	Síntesis, corte fuera del sitio diana.
Genes diana de enfermedades	Distrofina, α -D-glucosidasa, β -PDE, TYR	CFTR, ADN-PKcs, Distrofina, β -globina, SMN1	β -globina	COL1A1, COL1A2, FANCA, Fah, CFTR	CCR5, IL2Ry, CFTR, HoxB13, TYR

Tabla 4. Principales características de los métodos utilizados en terapia génica dirigida. a) Es importante resaltar que la eficiencias de corrección quizás no sean comparables directamente debido a las diferencias existentes en la forma de cuantificación y condiciones en las que se han realizado (por ejemplo, eficiencia contra eficacia, condiciones *in vitro* o *in vivo*...). SDF: Pequeños fragmentos de ADN, del inglés *small DNA fragment*. ssODNs: Oligo-desoxirribonucleótidos de cadena sencilla, del inglés *single-stranded oligodeoxynucleotides*. TFOs: Oligonucleótidos formadores de tripletes, del inglés *Triplex-forming oligonucleotides*. AAVs: Virus adeno-asociados, del inglés *adeno-associated viruses*. RHD: Reparación por homología directa, MMR: Reparación por desapareamiento de bases (del inglés *mismatch repair*), BER: Reparación por escisión de bases, NER: Reparación por escisión de nucleótidos, SFHR: Recombinación homóloga de pequeños fragmentos.

El desarrollo de nucleasas que generan DSB en un sitio específico del genoma ha permitido el avance en la tecnología de la terapia génica dirigida [312]. Así pues, en función de cómo se reparen estas DSB, el resultado puede ser la interrupción génica, la corrección o la adición génica. Puesto que en nuestro trabajo se han utilizado las nucleasas como herramienta para llevar a cabo la terapia génica basada en la adición genética, en particular del gen *FANCA* en el genoma de células de pacientes AF-A, nos centraremos en la comprensión del funcionamiento de este instrumento. En los siguientes apartados se explicará en detalle las características de las nucleasas de diseño mediante las cuales se realiza la modificación génica dirigida.

6. CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES DE LAS NUCLEASAS EN INGENIERÍA GENÉTICA.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, las nucleasas fueron una de las herramientas generadas para solventar el problema de la inserción génica al azar y permitir la modificación específica del genoma. Se diseñaron para introducir de forma específica una rotura de doble cadena (DSB) en un sitio concreto del ADN que tras ser reparada por RH o NHEJ permiten modificaciones dirigidas en el genoma [313]. Dependiendo del mecanismo utilizado para la reparación de las DSB se obtienen diferentes modificaciones genéticas. Así pues, mediante el mecanismo de NHEJ se pueden delecionar fragmentos cromosómicos o interrumpir la expresión de un gen, mientras que el mecanismo de RH nos permite delecionar un gen (*Knockout*), insertarlo en una región homóloga (*Knockin*) o heteróloga al mismo (adición génica) (Fig. 8).

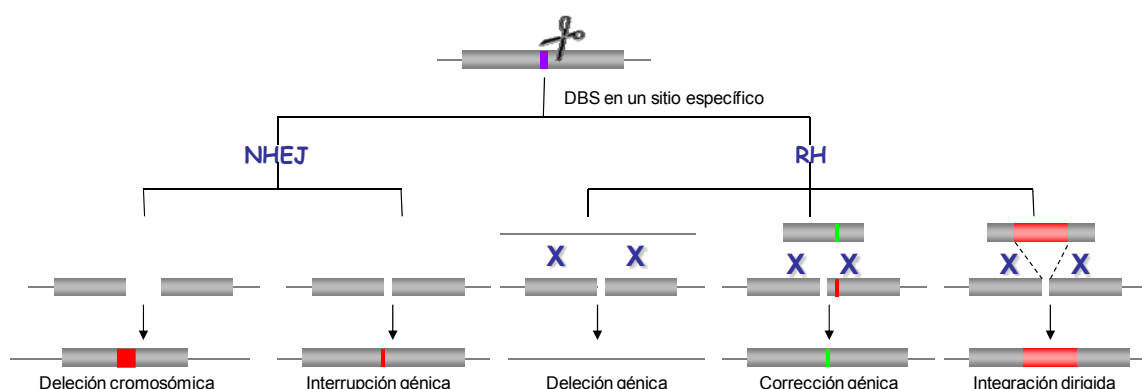


Figura 8. Efectos generados en el genoma tras la ocurrencia de una DSB. La generación de una DSB en el genoma desencadena rutas de reparación que dan lugar a distintos eventos que pueden ser aprovechados en terapia génica.

Existen cuatro tipos diferentes de nucleasas que se han utilizado en una amplia variedad de organismos para la modificación dirigida de su genoma: endonucleasas homing o meganucleasas (EHs o MGNs), nucleasas de dedos de Zinc (ZFN, del inglés *Zinc Finger Nucleases*), las nucleasas TALE (TALEN, del inglés *transcription activator-like effector nucleases*) y las endonucleasas de ADN dependiente de ARN Cas9 del sistema CRISPR (CRISPR, del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*). Todas ellas tienen en común el poseer un dominio de reconocimiento del ADN y otro dominio nucleasa con capacidad de generar DSBs.

A lo largo de este apartado se mencionarán brevemente las características de las cuatro endonucleasas más utilizadas actualmente en ingeniería genética, las ventajas y desventajas de cada una de ellas (Tabla 5) y profundizaremos en la explicación de las ZFN, puesto que han sido las que hemos utilizado como herramienta para el desarrollo de parte de este trabajo.

6.1. Meganucleasas.

Representan una familia de endonucleasas naturales de corte poco frecuente y que están presentes en todos los reinos de seres vivos. Reconocen largas secuencias de ADN de 12-45 bp [314, 315] y originalmente son codificadas por intrones o inteínas, actuando dentro de la propia célula que las sintetizan cortando el alelo homólogo que no contiene esta secuencia [316]. La inserción del elemento móvil se consigue gracias a la RH inducida por DSB [317]. La mayor limitación en el uso de

las meganucleasas (MGNs) es que sólo pueden ser diseñadas frente a algunas regiones que deben contener en el locus diana el sitio específico de corte del ADN.

Las MGNs se han subdividido en 5 familias diferentes. Una de las mejor caracterizadas es la familia representada por las proteínas LAGLI-DADG ya que son las que presentan una mayor especificidad global del reconocimiento del ADN y a cuyo grupo pertenecen las meganucleasas I-SceI y I-CreI (Fig. 9, [318]). A pesar de que se han identificado varios cientos de MGNs naturales, los sitios que reconocen en el ADN no cubren

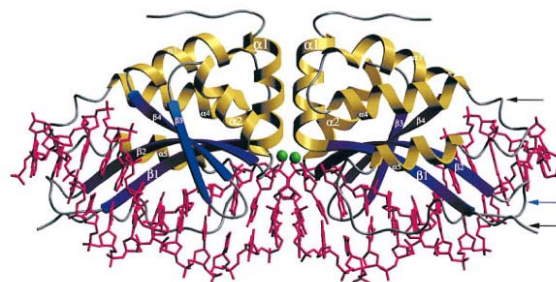


Figura 9. Ejemplo de estructura cristalina de una meganucleasa (CreI). En azul y amarillo están representados los dominios de la meganucleasa y en rojo el ADN. Figura tomada de Jurica y col, 1998.

ni con mucho todo el genoma humano, por lo que es prácticamente imposible encontrar un sitio de corte de MGN natural en una región genómica predeterminada. Para superar el límite que supone el repertorio de las MGNs naturales, éstas deben ser construidas mediante la fusión de diferentes dominios para generar proteínas quiméricas [319], lo que es una ardua tarea debido a la compleja interacción proteína-ADN que se debe producir para que ocurra de forma adecuada la catálisis del corte de la cadena de ADN, por lo que se han desarrollado diferentes estrategias para la generación de MGs basadas en la modificación de las MGNs naturales [320, 321]. Un ejemplo de una MGN realizada artificialmente es la utilizada para la eliminación del gen activador de la recombinación (RAG1) en células 293H [322]. A pesar de la existencia de alguna meganucleasa artificial, todavía resulta muy complicado generar MGNs para cortar sitios específicos del ADN, aunque en algunos casos se están utilizando en terapia génica.

6.2. Nucleasas TALE.

Estas nucleasas se han desarrollado recientemente como una herramienta muy útil para la ingeniería del genoma en plantas y animales. Al igual que en el caso de los ZFN, la construcción de las TALEN (del inglés, *Transcription activator-like effector nuclease*) se basa en el dominio catalítico de la endonucleasa *FokI* unido a un dominio de unión específica al ADN (Fig. 10, [323]). Estas proteínas fueron identificadas por primera vez en un patógeno de plantas, *Xanthomonas* [324].

La región de estas nucleasas que se une de forma específica al ADN está compuesta por secuencias altamente repetidas, que en los TALEs naturales varía entre 1,5 y 33,5 aminoácidos (aa_s). La longitud habitual es de cuatro aa_s y la mayoría de los aa_s están altamente conservados a través de las repeticiones, con la excepción de aquéllos situados en la posición 12 y 13. Estas dos localizaciones son altamente variables (RVD, del inglés, *repeat variable diresidue*) y confieren la especificidad de cada repetición al correspondiente nucleótido en la secuencia diana [325].

Como se ha descrito, el reconocimiento de la secuencia diana se basa en la sencilla relación existente entre aminoácido y la secuencia de ADN, lo que ha permitido generar multitud de TALENs con aplicación en ingeniería genética mediante la selección de la combinación adecuada de módulos de repeticiones conteniendo la RVD apropiada para la unión específica a un lugar del genoma. Sin

embargo, uno de los problemas de su construcción es la naturaleza altamente repetitiva de los módulos, lo que dificulta el ensamblaje.

En cuanto al dominio de corte, en un principio se utilizaba *FokI*, al igual que en las ZFN, que corta de forma no específica (la especificidad de reconocimiento viene dada por las secuencias adyacentes a la endonucleasa *FokI*), aunque últimamente se están investigando variantes mutadas de esta endonucleasa para implementar tanto la especificidad de corte, como su actividad. Este dominio funciona como un dímero por lo que es necesario tener en cuenta que para lograr una alta actividad de la nucleasa es necesario generar dos construcciones con un único dominio de unión al ADN que se sitúen sobre la diana en la orientación conveniente y dejando un espacio adecuado que permita su funcionalidad.

Desde el descubrimiento del código de reconocimiento de las TALE en 2009 [326] la utilización de las TALEN en ingeniería genética en mamíferos se ha desarrollado notablemente, debido, entre otras causas, a la facilidad de su diseño [327]. Aunque no se van a describir en profundidad todos los trabajos realizados utilizando TALEN, hay que mencionar que se han utilizado para modificar locus endógenos en CMEs y iPSCs humanas. Por ejemplo, Hockemeyer y colaboradores probaron la eficiencia con las que las TALEN fueron funcionales en los genes *PPP1R12C*, *OCT4* y *PITX3*, al igual que hicieron con los ZFN, y observaron que las eficiencias eran similares en ambos casos [328]. Aunque la comparación entre ZFNs y TALENs no está del todo establecida, sí es verdad que existen trabajos en los que se demuestra que tanto TALENs como ZFNs tienen una eficacia similar, pero las primeras son más fáciles de diseñar [323].

6.3. Endonucleasa de ADN dependiente de ARN Cas9 del sistema CRISP (CRISPR, *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*).

El sistema CRISPR/Cas9 ha surgido recientemente como una nueva herramienta para introducir alteraciones en el genoma. De forma natural, CRISP (del inglés *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) y las proteínas asociadas a CRISP (CRISPR/Cas) constituyen un sistema inmune adaptativo en procariotas para prevenir las infecciones virales o las invasiones de elementos de ADN móviles [329-331].

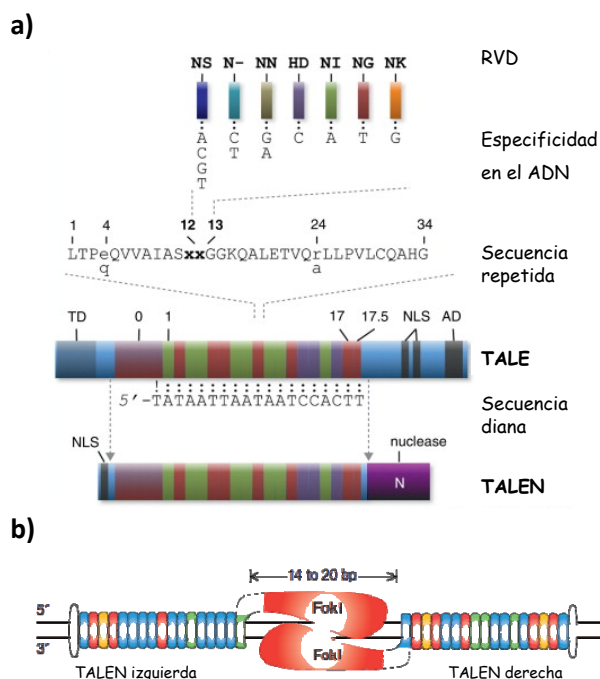


Figura 10. a) Esquema de una TALEN. Un típico TALE está formado por un dominio de translocación N-Terminal (TD), las unidades centrales de repetición que permiten la unión al ADN y la región C-terminal que contiene señales de localización nuclear (NLS) y un dominio de activación transcripcional (AD). Los residuos 12-13 hiper variables dictaminan la especificidad de unión al AND del modulo repetitivo. Finalmente la TALE se une al dominio nucleasas (TALEN). Imagen modificada de Mussolino y col, 2012. b) Dibujo esquemático de la unión de las TALEN al ADN diana.

Actualmente se han descrito diez sistemas CRISPR/Cas diferenciados entre sí tanto por la diversidad del *cluster* CRISPR [332], como por la organización del operón CRISPR, constituido por un conjunto diferente de genes asociados a CRISPR (Cas) que codifican para proteínas con diversas actividades bioquímicas [333]. Estos diez sistemas, a su vez, se han subdividido en tres categorías basadas en el proceso que tiene lugar para la maduración de las pequeñas moléculas de ARN (ARNcr, ARN CRISPR), el tipo de elemento contenido en el núcleo del complejo efector al que se une el ARNcr y la forma en la que se lleva a cabo la inactivación de los ácidos nucleicos [334-337].

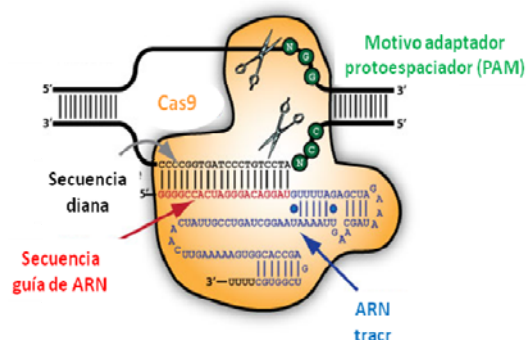


Figura 11. Esquema del funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9 como nucleasa. El complejo ternario Cas9-ARNcr-ARNtracr se une a la secuencia diana donde media un corte específico en el ADN.

De todos los sistemas descritos, el tipo II es el que ha sido planteado como una nueva herramienta para modificar el genoma, por lo que será descrito con mayor profundidad. Está formado por una proteína multidominio Cas9, teniendo dos de los dominios actividad nucleasa (el dominio nucleasa similar a Ruv próximo al extremo aminoterminal y el dominio similar a HNH en el medio de la proteína)[333]. Esta proteína, a su vez, forma un complejo ternario con dos moléculas de ARN: con el ARNcr (CRISPR ARN) y con el ARNtracr (ARN CRISPR trans-activante) que complementa parcialmente al ARNcr [334, 338-340]. El ARNcr consta de 42 nt, 22 de los cuales forman la secuencia repetida y 20 nt únicos que forman la secuencia espaciadora, y es el encargado de guiar a Cas9 hacia el ADN diana, mientras que el ARNtracr es necesario para la maduración del propio ARNcr y para que tenga lugar el corte mediado por Cas9 [339, 341] (Fig. 11).

Es decir, las CRISPR/Cas9 consisten en un conjunto de varias repeticiones cortas conservadas separadas por una única secuencia de ADN denominada espaciador y que se origina a partir del ADN de un fago o de un plásmido de ADN. La secuencia única o espaciador es utilizada posteriormente como molde para generar pequeñas moléculas de ARN (ARNcr, ARN CRISPR) que, en combinación con las proteínas Cas, dan lugar a un complejo efector que silencia los ácidos nucleicos foráneos. Esto es porque el sitio Cas9 media un corte DSB en la diana de ADN tras unirse a esta secuencia. Este sitio, denominado postespaciador, está compuesto por unos nucleótidos a los que se une el ARNcr y una secuencia corta de nucleótidos denominados como motivo adyacente al postespaciador (PAM). Es necesario que ambas secuencias estén presentes para que Cas9 se una a la secuencia diana y genere el lazo-R que es donde se une el ADN y el ARNcr [341, 342].

Se ha demostrado que para que la diana sea reconocida por la proteína Cas9 es necesario que exista una secuencia “raíz” dentro del ARNcr y que la secuencia PAM situada aguas arriba del sitio de unión del ARNcr también esté conservado. Esto permite que el sistema CRISPR/Cas pueda ser rediseñado de forma sencilla con la única modificación del crARN y así pueda cortar otra diana distinta. Por ello, debido al funcionamiento de este complejo y su simple organización modular (Cas9-ARNcr-ARNtracr), CRISPR/Cas9 se ha utilizado como una nueva herramienta para el editado

genético puesto que es relativamente sencillo generar secuencias específicas de ADN codificadas por ARNcr [343].

Alguna de las ventajas que tiene esta nueva tecnología en comparación con las ZFNs y las TALEN son:

- El diseño de estas proteínas se consigue mediante la construcción de ARNs, lo que hace que éste sea más rápido y barato en comparación con el diseño de otras nucleasas como las ZFN o TALEN que tras ser clonadas, además tienen que ser seleccionadas posteriormente y validadas. Este fácil diseño también permite generar estas nucleasas de modo que tengan como dianas dos secuencias diferentes en una misma célula, utilizando una única proteína Cas9 y varios ARNs. [344, 345].
- En segundo lugar, existen mutantes de Cas9 que pueden introducir cortes en la diana, tanto en la cadena superior como en la inferior [30,31] lo que abre nuevas posibilidades en la reparación del ADN por RH [345, 346].

A pesar de que estas endonucleasas han sido capaces de interrumpir distintos genes [345] y facilitar la integración dirigida en iPSCs [346, 347] con altas eficacias [348], se ha observado que, en general, son menos específicas que las TALEN o ZFNs, de modo que introducen cambios no deseados en sitios fuera de la diana (efecto *off-target*) [345, 349].

6.4. Nucleasas de Dedos de Zinc (ZFN, *Zinc finger nucleases*)

Son nucleasas artificiales de ADN que se construyen por medio de la fusión de varios dominios de dedos de Zinc (ZF, del inglés *Zinc Finger*) con el dominio nucleasa de la enzima de restricción *FokI* de tipo IIS [269, 350]. Los dominios, que están compuestos por un conjunto de 3-5 dedos de Zinc Cys₂His₂, tienen como función la unión específica al ADN y dirigen los ZFN a su diana en el ADN, mientras que el dominio endonucleasa es el que posee la actividad enzimática que cortará las cadenas de ADN.

El dominio de dedos de Zinc Cys₂-His₂ es el motivo de unión al ADN más común en el proteoma humano y consiste en 30 aminoácidos en configuración $\beta\beta\alpha$, donde la α hélice se une al arco mayor de ADN y reconoce de 3 a 4 bases de nucleótidos contiguas [351]. La estructura modular del motivo de ZF permite la elaboración de varias series de dominios, lo que posibilita el reconocimiento de casi cualquier diana del genoma de cualquier especie.

Se sabe que el dominio *FokI* (del procariota *Flavobacterium okeanoikoites*) corta de forma no específica en el ADN funcionando con un dímero y que este corte ocurre más eficientemente cuando dicho dímero está en orientación inversa [352], por lo que la configuración óptima para el diseño de los ZFN es como heterodímeros que reconocen una secuencia de ADN de entre 18-24 pb con un espacio de 4-6 pb entre los sitios de unión entre cada mitad [353-356]. Cada monómero de ZFN está compuesto por tres o cuatro dominios de ZF que reconocen una secuencia diana de ADN de 9 a 12 pb, y, a su vez, cada dominio típico de ZF contiene una α -hélice que reconoce de forma específica un triplete de ADN (Fig. 12). Una vez que la DSB ha sido generada por los ZFNs, la célula puede activar principalmente dos mecanismos diferentes de reparación del daño, la RH, que es la vía preferente cuando existen disponibles altas cantidades del ADN donador, y por otro lado la ruta de NHEJ [357-359].

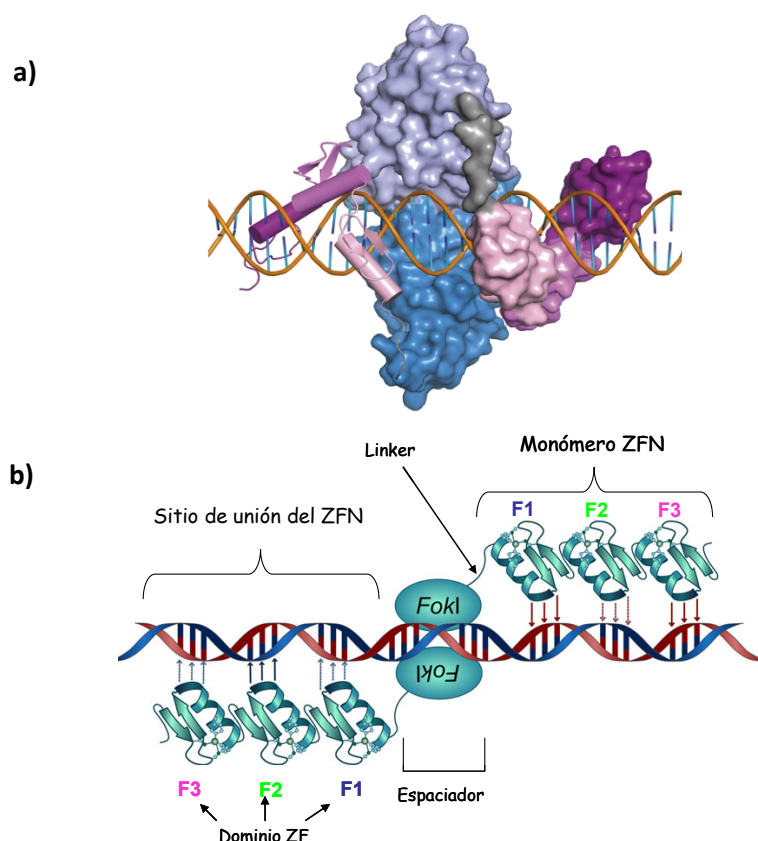


Figura 12. a) Estructura de una pareja de ZFN unidas al ADN. Cada ZF se muestra en rosa, el dominio de corte *FokI* en azul, los 4 aa que componen el *linker* en gris, el ADN en naranja y los pb en naranja y azul. Esta imagen ha sido obtenida de Smith y col [352]. **b) Esquema de la unión de una nucleasa ZFN al sitio diana en el ADN.** El ZFN activo se coloca en una estructura homodimérica donde cada monómero se une en una configuración cola-cola. Cada monómero de ZFN está formado por tres proteínas zinc-finger que se unen al dominio de corte *FokI* a través de un péptido de unión. Esta nucleasa se sitúa en el espacio de 5-6 nt entre los dos sitios de unión de los ZF. Cada ZF está compuesto por 30 aa que se unen en configuración $\beta\beta\alpha$ coordinados por un átomo Zn^{+} . Cada ZF une 3 aa de la α -hélice a 3 pb en el ADN.

El diseño de estas nucleasas es más sencillo que el de las meganucleasas [274, 288, 358-361] pudiéndose utilizar para ello diferentes estrategias como son el ensamblaje modular [362, 363], el método “OPEN” (del inglés *Oligomerized Pool Engineering*) [364] o el método “CoDA” (del inglés *Context-Dependent Assembly*) [365]; existiendo además plataformas como CompoZrTM que los distribuyen comercialmente. Puesto que los dominios de dedos de Zinc (ZF) funcionan como módulos de reconocimiento del ADN, la modificación de estos dominios puede dirigir las ZFNs a nuevas secuencias del ADN.

Al igual que en el resto de nucleasas de diseño, una limitación de las mismas es que toleran ciertos errores en el reconocimiento de bases de ADN, por lo que en algunos casos pueden cortar en sitios fuera de su diana (sitios *off-target*) [8, 366], lo que provoca la generación de DSBs en lugares no deseados y por lo tanto, es necesario estudiar la especificidad de corte en cada diseño para así elegir aquellas nucleasas que no producen estos efectos.

Actualmente estas nucleasas se están utilizando en un gran número de aplicaciones tales como la disrupción génica, la adición o inserción génica, la corrección génica y también la reorganización de cromosomas, aplicaciones que serán explicadas en detalle en el apartado 7.1.






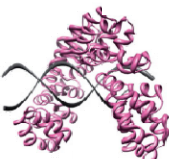
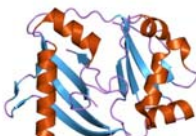

	Meganucleasas	TALEN	CRISPR/Cas9	ZFN
Longitud típica del sitio de reconocimiento	14-40 pb	30-50 pb con 10-30 pb de espaciador	20 pb +PAM (4-5 pb)	18-24 pb con 5-7 pb de espaciador
Tamaño típico de la proteína	<40 kDa	>100 kDa ^a	<25 kDa	<30 kDa ^a
Modularidad	Baja Dominio de reconocimiento de la diana	Alta Dominios TALE	Baja ARN (+PAM)	Media Dedos de Zinc
Módulo de corte	Dominio nucleasa	<i>FokI</i>	Cas9	<i>FokI</i>
Diseño	Complejo si no se usan las naturales. Requiere ingeniería proteica.	Relativamente fácil. Requiere reorganización de dominios, ensamblaje e ingeniería proteica (4 semanas)	Fácil y rápido. Sólo se necesita la generación de una ARN guía.	Complejo. Requiere reorganización de dominios, ensamblaje e ingeniería proteica (10 semanas)
Adecuación al sustrato	Difícil	Fácil	Fácil	Fácil
Eficiencia de corte	Alta	Media	Media	Media
Eficiencia de modificación de la diana	Media	Alta	Alta, depende de PAM	Alta
Esquema de unión al ADN				
Estructura cristalina				

Tabla 5. Principales características de los diferentes tipos de nucleasas. Comparación, ventajas y desventajas [a] Tamaño proteico de cada monómero]

7. TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA CON ZFNs

Puesto que las ZFNs han sido las nucleasas que se han utilizado como herramienta en la elaboración de parte del proyecto descrito en esta tesis, en este apartado nos centraremos en ellas y en él se describirán las aplicaciones de estas nucleasas en profundidad, así como los problemas y ventajas que están asociados a su uso.

7.1. Aplicaciones de las nucleasas ZFN en terapia génica.

El origen de estas nucleasas data del año 1996, cuando se crearon por primera vez ZFN que funcionaban como endonucleasas quiméricas de restricción y con actividad *in vitro* [367]. Desde que las ZFN fueron diseñadas por primera vez se han utilizado con éxito en genes individuales de una gran variedad de especies, donde las frecuencias de modificación de la diana están en torno al 10% [368]. A continuación se estudiarán en detalle las diferentes aplicaciones que ha tenido esta herramienta molecular hasta el momento.

■ Interrupción e inactivación génica.

La interrupción de un gen ocurre tras la reparación de la DSB mediante NHEJ (Fig. 13a). Esta técnica se ha aplicado en varios tipos celulares de mamíferos para silenciar eficientemente genes diana (*knockout*)[369]. Algunos de los trabajos más destacados en humanos son dos estudios clínicos

para el tratamiento de la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), basados en la interrupción del gen *CCR5*, uno de los co-receptores utilizados por el VIH para su entrada en la célula [370, 371], y el tratamiento de hepatitis B utilizando ZFNs dirigidos contra el genoma del virus de la hepatitis B [372].

Además de la interrupción génica mediante NHEJ también se puede eliminar la expresión de un gen mediante RH inducida por DSB (Fig. 13b). De este modo, se ha inactivado el locus endógeno *PIG-A* asociado con la hemoglobinuria paroxismal nocturna en células madre embrionarias (CMEs) y en células madre pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *induced pluripotent stem cells*) [290].

■ Inserción génica dirigida.

Mediante la reparación del ADN inducida por ZFNs también es posible insertar un gen en un lugar preciso del genoma (Fig. 13b), lo que ha servido tanto para evaluar la seguridad de inserción de un determinado gen en un locus determinado, como para corregir enfermedades. Así, por ejemplo, se ha insertado el gen eGFP (del inglés *enhanced green fluorescent protein*) en diferentes locus tales como *OCT4*, *AAVS1* y *PITX3* [289] [373], logrando eficiencias de inserción de hasta el 15% tanto en líneas transformadas (K562, HeLa, HEK293...) como en células humanas primarias (fibroblastos y CMEs) [373]. Por otro lado, la integración de una copia única del gen *gp91 (phox)* en el locus *AAVS1* para el tratamiento de la granulomatosis crónica ligada al X (X-CGD), logró restaurar la producción de ROS en neutrófilos diferenciados de un clon de iPSCs de un paciente con X-CGD [374].

■ Corrección génica.

La corrección génica ocurre gracias a la reparación de las DSB mediante RH y su aplicación tiene especial relevancia en el tratamiento de enfermedades monogénicas. A diferencia de la inserción génica en un locus seguro del genoma, en este caso la corrección se lleva a cabo *in situ*, es decir en el propio gen que se quiere corregir, por lo que el corte de las ZFN debe ser aún mucho más preciso (Fig. 13b). Algunas de las patologías en la que se han utilizado esta tecnología para corregirlas han sido la inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X, en la que se utilizaron ZFNs dirigidos contra el gen *IL2R γ* , el gen mutado en esta enfermedad, consiguiendo una tasa de modificación del 10-20% en una población celular policlonal [288]; la anemia falciforme para la que existen varios trabajos dirigidos a la corrección del gen de la β -globina en iPSC derivadas de pacientes [364, 375, 376]; la deficiencia de la α 1-antitripsina en la que se utilizó un transposón de ADN derivado de la polilla, *piggyBac*, junto con los ZFNs para corregir una mutación puntual en el gen *A1AT* que causa esta deficiencia [377]; o la enfermedad de Parkinson para la que se intentó una estrategia de terapia génica dirigida, libre de selección, introduciendo un brazo de homología alrededor del sitio de corte del ZFN en el gen que se quería reparar (el gen de la α -sinucleína), consiguiendo aislar un clon corregido de 240 mediante la técnica de *southern blot* (SB) [378].

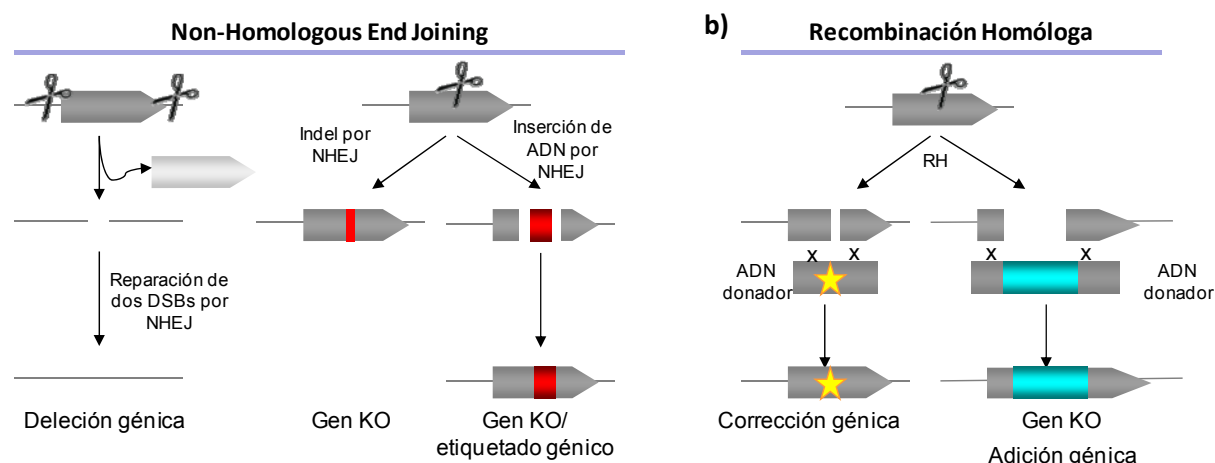


Figura 13. Edición génica tras la generación de DSB con ZFNs. a) Modificación genética vía NHEJ en un gen. Se puede interrumpir un gen mediante la generación de pequeñas indels, mediante la introducción de pequeños fragmentos de ADN, o tras la generación de dos DSB en los extremos del gen. **b) Modificación genética mediante RH.** Se puede inducir la corrección génica, el silenciamiento de un gen o la adición de un gen en un sitio determinado utilizando un donador de ADN adecuado.

■ Reordenamientos cromosómicos.

Dentro de los reordenamientos cromosómicos se incluyen deleciones, inserciones duplicaciones e inversiones. Los ZFNs se han utilizado en este sentido para estudiar funciones genéticas a nivel genómico y los reordenamientos son generados cuando se producen dos DSBs simultáneas, demostrándose que la frecuencia con que dos DSBs simultáneas pueden generar inversiones y duplicaciones génicas en células humanas varía entre 0,01 y 5% [281].

Una aplicación terapéutica de esta técnica, que se ha realizado como prueba de concepto, ha sido la construcción de un par de ZFN dirigidos contra el intrón 1 homólogo en el gen F8 humano, cuya inversión causa hemofilia A severa. De este modo se logró la inversión de un segmento de 140kb de ADN (0,2-0,4%) y se demostró que es posible restaurar la integridad cromosómica en pacientes con hemofilia A severa revirtiendo la inversión del segmento de ADN para que vuelva a la orientación original [379].

7.2. Mecanismos de introducción del ADN donador y los ZFN en el núcleo celular.

La eficiencia en la corrección genética varía según el organismo, el tipo de célula que se quiere corregir y la diana genética. Otro de los parámetros claves para el éxito de la terapia génica dirigida es la eficacia de entrada del ADN donador y los ZFN en el núcleo celular, ya que las frecuencias tanto de NHEJ como de RH se correlacionan con la cantidad de endonucleasa introducida en la célula [380]. A continuación se describen los diferentes sistemas utilizados hasta el momento para introducir las nucleasas en las células (Tabla 6):

- ✦ **Microinyección en embriones.** Se ha realizado con éxito en *Drosophila* (hasta el 10% de la descendencia) [271] y en sistemas de mamíferos para expresar ARNm o ADNs de ZFN o TALEN, con el objetivo de interrumpir [272, 275, 276, 381-383], reemplazar o integrar un gen utilizando RH [383-385].
- ✦ **Microinyección en tejidos.** A pesar de que la microinyección de embriones ha tenido gran éxito para realizar ingeniería genética en animales, en tejidos difícilmente se consiguen eficiencias más altas del 5%, lo que supone un problema para aplicar esta tecnología con fines terapéuticos.

- ✦ **Electroporación o transfección lípido catiónica.** Se ha utilizado ampliamente para introducir nucleasas, en forma de ARN o ADN, en células madre y líneas celulares en cultivo, obteniéndose eficiencias de entre el 5 y 30%, y tasas de mortalidad relativamente bajas, que no comprometen la supervivencia [289, 373, 375, 378, 386]
- ✦ **Transducción viral.** Se han utilizado vectores lentivirales deficientes en integración (IDLV, del inglés *integrase defective lentiviral vector*), adenovirales (AdV), vectores adenoasociados (AAVs) y vectores derivados de baculovirus [387]. Nos centraremos en los tres primeros, ya que son con los que mejores resultados se han obtenido.
 - Los vectores AdV, como ya se mencionó, tienen su origen en virus de ADNbc lineal y las principales ventajas que presentan respecto al resto de sistemas virales son que no se integran en el ADN del huésped y que son virus de alta capacidad, pudiendo portar ADNs de hasta 37 kb. Además, al igual que los vectores lentivirales, pueden transducir *in vivo* e *in vitro* células en división y quiescentes [388]. Existen varios serotipos, siendo el más utilizado el serotipo 5. Han sido utilizados en varios trabajos obteniéndose altas eficiencias de corte. En uno de ellos fueron utilizados para expresar ZFNs que interrumpieron aproximadamente el 50% de los alelos de CCR5 en una población de células T CD4⁺ humanas [371]. También se han utilizado para expresar TALENs, observándose que eran más eficaces que los lentivirus en células humanas inmortalizadas y primarias, y que se producía la cantidad suficiente de proteína para inducir DSBs a alto nivel en la diana génica [389].
 - Los AAV son un método de transporte eficiente debido a su inherente predisposición para la RH [390], sin embargo presentan problemas como son la baja capacidad de empaquetamiento y que su capacidad de transducción es muy dependiente del tipo celular [391]. Algunas estrategias para aumentar la eficacia de *gene targeting* utilizando AAV han consistido en la modificación de los serotipos naturales de los AAVs [392], en la utilización de un AAV autocomplementario que produce un genoma de doble cadena y que puede aumentar hasta 20 veces la corrección con un gen marcador respecto al porcentaje obtenido con los AAV de cadena sencilla [393], y en el uso combinado de los AAVs junto con inhibidores del proteasoma o de la histona deacetilasa [394].
 - Los VLs son los otros vectores que más se han utilizado para su uso en terapia génica dirigida. Puesto que se trata de virus integrativos, se han generado vectores defectivos en integrasa (IDLV) para dirigir los ZFN a diferentes dianas genéticas en diferentes tipos celulares, lográndose unas eficiencias de inserción génica de hasta el 50% [279].

	Material genético desnudo (ADN/ARN)			Vectores virales		
	Microinyección en tejido	Electroporación/nucleofección	Lípidos catiónicos	AdV	IDLV	AAV recombinantes
Eficiencia	Baja	De moderada a alta	Variable ^a	Alta	Alta	Alta
Tamaño de inserto	Sin límites ^b	Sin límites ^b	Sin límites ^b	37kb	8 Kb	4,5 Kb
Integración al azar	<0,1%	<0,1%	<0,1%	No	≤1%	≤10% ^c
Respuesta inmune	Bajo	Alta	Alta	Baja (3 ^o Gn virus)	Baja	Muy baja
Títulos virales producidos	-	-	-	Alta	Alta	Alta
Estado celular	En división	En división/no división	En división	En división/no división	En división/no división	En división/no división

Tabla 6. Comparación de los métodos de transporte génico actuales utilizados para el transporte de nucleasas (Tabla modificada de Sun y col, 2012 [395]).

a) Baja para transporte génico local y sistémico, variable en diferentes cultivos celulares.

b) Moléculas de ADN de gran tamaño (>10kb) han impedido la entrada en el núcleo de células que no se están dividiendo.

c) AAV nativo se integra en una frecuencia del 10-20% en el cromosoma 19.

7.3. Factores a tener en cuenta en el uso de ZFN.

■ Especificidad de los ZFN y corte en sitios fuera de la diana (*off-target*).

La clave de la terapia génica dirigida es la especificidad de las nucleasas utilizadas. Es de vital importancia no sólo aumentar la frecuencia de corte en el sitio deseado en el genoma, sino prevenir también el corte fuera del sitio diana. El corte de las nucleasas en sitios no deseados se denomina como actividad “*off-target*” y, aunque es un evento poco frecuente, puede ocurrir y producir problemas como la disminución de la frecuencia de corte en la diana, una interpretación engañosa de los resultados y el incremento de la toxicidad celular debido a efectos colaterales deletéreos. Por ejemplo, el incremento de DSBs puede aumentar el número de translocaciones oncogénicas [396, 397].

El corte en localizaciones fuera de la diana suele ocurrir en sitios que guardan una elevada homología con el sitio diana canónico. La especificidad de una pareja de ZFN que tiene como diana una secuencia de 18 bp está estimada teóricamente en una de cada 7×10^{10} pb (más grande que el genoma humano). Sin embargo, en la práctica, está demostrado que existen parejas de ZFN que reconocen secuencias que sólo tienen el 66% de homología con la diana (toleran hasta 8 errores por cada 24 pb de la diana) [398]. Así pues, para utilizar estas nucleasas es muy importante conocer en detalle las consecuencias de la toxicidad de que los ZFN corten en sitios fuera de la diana (sitios *off-target*). Para ello, se han utilizado distintos métodos como:

- Monitorizar la presencia de células transfectadas a lo largo del tiempo para estudiar su desaparición debido a la toxicidad, observándose que los ZFNs que tienen una alta afinidad por su diana son menos tóxicos que aquellos que tienen menos afinidad [399].
- Métodos indirectos para testar la integridad del genoma tras la actividad de los ZFN, estudiando la presencia del contenido de ADN subG1 o utilizando, por ejemplo, inmunotinción para marcadores de DSBs como γ H2AX y la proteína de unión a p53 (p53BP1) [356].
- Secuenciación de alto rendimiento: Aunque es el método más eficaz y sensible para medir los efectos del corte no específico con los ZFN este método aún no es viable, ni asequible para el

aislamiento de los clones más seguros para ser utilizados con fines terapéuticos, aunque sí que es utilizado para la selección de la pareja de ZFN más eficaz.

Además una de las consecuencias de que ocurran cortes fuera de la diana es que la integración del ADN donador no ocurra en el sitio deseado en el genoma. Esto se puede testar mediante la técnica de Southern blot utilizando sondas externas e internas al casete integrado o mediante la realización de qPCRs para evaluar el número total de copias del vector integrado y PCRs convencionales que nos indiquen que la región integrada está en un sitio específico en el genoma utilizando oligos que hibriden con la región de homología y con el donador insertado [373].

Algunas de las medidas que se han tomado para evitar el problema de corte fuera de la diana se han dirigido hacia un diseño de nucleasas altamente específicas siguiendo las siguientes directrices:

- Determinación del sitio de unión consenso de un ZFP mediante una técnica experimental denominada como SELEX (evolución de ligandos sistemática por enriquecimiento exponencial) [400, 401]. De este modo se determinan, tras un estudio bioinformático, las regiones de alta similitud con el sitio diana, y por tanto, los posibles sitios *off-target*.
- Realización de cambios en las proteínas dedos de zinc (ZFPs) para mejorar su unión *in vivo* al genoma [288].
- Utilización de módulos de dos dedos para incrementar el sitio de reconocimiento de 9 a 12-18 pb, de modo que los ZFN reconozcan un único sitio en el genoma.
- Uso de dominios de obligada heterodimerización que promueva la formación de un heterodímero con pares particulares de ZFN para la inducción de DSB [356, 402].
- Finalmente, una forma de minimizar el riesgo de corte fuera del sitio diana sería controlando el momento de expresión de los ZFN y el tiempo de duración de esta expresión [403].

■ Combinación de ZFN y vector donador.

Otra de las optimizaciones que se deben llevar a cabo es la de encontrar la combinación adecuada de los ZFN y del ADN donador que permita la máxima eficiencia y la mínima toxicidad. Para ello se han utilizado sistemas tanto virales como no virales (apartado 7.2, Tabla 6) [404, 405].

■ Ruta de reparación

Finalmente, otro de los factores que influyen en la correcta modificación de una diana genética utilizando nucleasas es la ruta de reparación de DSB escogida por la célula (RHD o NHEJ). La ruta preferencial para reparar el ADN es el NHEJ, lo que puede disminuir la eficiencia de la adición génica y aumentar potencialmente la mutagénesis. Por ejemplo, se ha reportado que en algunos de los clones que han sido modificados en heterocigosis, el alelo no editado sí que ha sido cortado por el ZFN y posteriormente reparado por NHEJ, introduciéndose mutaciones en ese sitio [289]. Por ello, la investigación debe encaminarse hacia la búsqueda de mecanismos que potencien la RHD e inhiban la NHEJ para evitar mutaciones deletéreas y aumentar la eficiencia y seguridad de los procesos de modificación genética dirigida.

8. SITIOS SEGUROS PARA LA INTEGRACIÓN DE GENES EN EL GENOMA HUMANO.

Como se ha venido explicando a lo largo de la introducción, la inserción controlada del ADN en un sitio determinado del genoma que minimice los riesgos de mutagénesis insercional, silenciamiento génico, etc., es uno de los objetivos actuales de la terapia génica de adición.

A priori, cabría esperar que la mejor estrategia sería la de introducir el gen foráneo en el locus que éste ocupa dentro del genoma. Esta técnica nos permite generar *Knock-in*, corrección *in situ* de mutaciones y la regulación fisiológica del transgén; sin embargo, la inserción de un gen en su propio locus no exime de riesgos a la célula, ya que si se integra en exones pueden existir problemas como el que la utilización de nucleasas produzca la delección de bases, efecto que ocurre, por ejemplo, cuando la reparación del daño producido es reparado por vías como el NHEJ, en vez de por RH. Esto puede alterar la correcta expresión fisiológica del gen y perturbar transcripcionalmente a los genes que lo flanquean, alterando el comportamiento celular o favoreciendo la transformación de éstas. Además, estos inconvenientes se ven incrementados cuando además del gen terapéutico se introduce también un gen marcador, suicida o con funciones de selección.

Por ello, una alternativa a esta estrategia es la inserción del casete que contiene el gen que se quiere expresar en “sitios seguros del genoma” (del inglés *safe harbor*). Se trata de regiones intragénicas o extragénicas del genoma humano que son capaces de hospedar genes autólogos o heterólogos en ellas y que estos se expresen adecuadamente sin efectos adversos para la célula hospedadora o el organismo. Un sitio seguro tiene que permitir la expresión suficiente del transgén para producir la proteína que codifica y, además, debe no predisponer a la célula a la transformación maligna ni alterar las funciones celulares. Los criterios para definir un sitio seguro son:

- Que facilite la expresión estable de los transgenes integrados en el sitio seguro en todos los tipos celulares de interés.
- Que no existan efectos adversos en las células debido a la inserción en el locus diana y/o a la expresión del transgén.
- Que no se interrumpan genes codificantes y regiones ultraconservadas en el genoma, ni se altere su expresión; es decir, que haya una mínima interacción entre activadores transcripcionales presentes en el casete de RH y los promotores de los genes adyacentes.

Como se ha mencionado los sitios seguros se pueden encontrar tanto en genes como en regiones extragénicas, asumiendo el que si se sitúan en genes, éstos deben ser no esenciales, para que su interrupción no tenga consecuencias patológicas y deben estar distribuidos ampliamente a lo largo de los diferentes tejidos. También se pueden utilizar como diana sitios intragénicos dentro de regiones génicas que pueden hospedar genes exógenos sin consecuencia, al menos, en algunos tipos celulares [7]. La otra alternativa es utilizar desiertos génicos que son zonas menos problemáticas para la introducción de genes pero en las que la expresión de los genes exógenos introducidos se puede ver disminuida.

Estos sitios seguros requieren una validación funcional. En primer lugar, habría que medir el efecto del transgén integrado en la expresión de genes vecinos en células en cultivo, así como las marcas epigenéticas del locus diana antes y después de la introducción del transgén, y también se debería introducir cualquier tipo de unidad transcripcional en su interior sin que la expresión de los

genes flanqueantes se vean afectadas (regiones de control de locus, regiones de anclaje de la matriz, promotores, potenciadores o aislantes de la expresión). Estos estudios deberían realizarse posteriormente *in vivo* para corroborar que no hay una disfunción en el tejido o una tendencia a la transformación.

Aunque no se ha validado completamente un sitio seguro que cumpla estrictamente todas las características para serlo, se han propuesto tres sitios seguros en el genoma humano: el sitio 1 del virus adenoasociado (AAVS1), C-C quimión receptora de tipo 5 (CCR5) y el ortólogo humano del locus de ratón *ROSA26*.

■ CCR5.

Este locus se sitúa en la posición 3p21.31 y codifica el principal co-receptor del HIV-1. El interés de su utilización como sitio seguro para la inserción de genes surgió con la evidencia de que individuos que presentaban en homocigosidad una mutación nula en este gen (CCR5 Δ 32) eran resistentes a la infección con el HIV-1 y no se observaba ninguna patología derivada de la pérdida de su expresión [371, 406].

Como se ha mencionado, un sitio seguro debe permitir la expresión del transgén en los tipos celulares de interés. La expresión endógena de CCR5 es alta en linfocitos T, monocitos y macrófagos, pero no en linfocitos B o células dendríticas, y se expresa de forma variable en neuronas, microglía, endotelio y células musculares lisas [407]. Además, aunque no se conocen exactamente los efectos de su interrupción, es cierto que los ratones CCR5^{-/-} muestran una migración de leucocitos dañada y un incremento de la susceptibilidad a ciertas infecciones [408]. Otra de las desventajas que presenta es que la expresión de un gen marcador *GFP* en células T fue mucho más baja cuando se introducía en el gen CCR5 que cuando se hacía en el locus AAVS1 [7]. Por último, también habría que mencionar que en el locus donde se encuentra CCR5 están contenidos otros genes, incluidos genes relacionados con cáncer que podrían ser alterados por la expresión de un transgén [7].

■ Ortólogo humano de *Rosa26*.

En ratón, el gen *Rosa 26* ha sido uno de los locus utilizados para transgénesis en CMEs. En 2007, Irion y col. identificaron el ortólogo de este locus en humanos en la posición 3p25.3 [409]. Para estudiar si era un sitio seguro se insertó en él un gen que codificaba la proteína roja fluorescente (RFP) y se observó que se expresaba en múltiples tejidos humanos a niveles variables y que la inserción del locus no generaba ninguna anomalía aparente, pero, al igual que el caso anterior, este locus está situado cerca de genes que pueden ser potencialmente desregulados.

■ AAVS1.

Este locus, situado en el cromosoma 19 (19q13.42), fue identificado como un sitio habitual de integración del virus humano no patogénico adeno asociado (AAV) [410], interrumpiendo la subunidad reguladora 12C del gen de fosfatasa (*PPP1R12C*, también conocido como MBS85), que codifica una proteína cuya función no ha sido del todo dilucidada, por lo que no se conocen efectos adversos derivados de su perturbación. Por ello, este sitio ha sido utilizado para terapia génica dirigida en células T humanas, células madre neurales, células madre embrionarias (CMEs) y células

madre pluripotentes inducidas (iPSCs) [289, 373, 374, 411-413]. Estos estudios demostraron que existía expresión del transgén integrado en el locus *AAVS1* y se mantenía en tejidos de las tres capas embrionarias tras la diferenciación, aunque no se sabía si afectaba a los genes flanqueantes.

Además, posteriormente se estableció el sitio *AAVS1* como un locus adecuado como diana para la inserción de un transgén, ya que no existían efectos dañinos derivados de la integración [7]. Frente al locus *CCR5* presenta varias ventajas como son que la expresión de los transgenes insertados en *AAVS1* es más alta en varios tipos celulares debido a que *CCR5* posee marcas en la cromatina represoras, mientras que el gen *PPP1R12C* tiene una cromatina abierta y activa y que se transcribe constitutivamente en la mayoría de los tipos celulares. Además, en el sitio *CCR5*, la inserción de un casete de expresión mostró una inducción de la expresión de los genes flanqueantes, mientras que la inserción en el sitio *AAVS1* no producía alteración en los genes circundantes, posiblemente debido a la presencia de un aislador de la cromatina, que previene la estimulación de la expresión génica [414]. Y finalmente, también hay que mencionar que los ZFNs descritos para generar DSBs de forma específica en este locus son altamente específicos y no generan *off-targets* [8, 289].

Por todo ello, la inserción en *AAVS1* es preferible, no sólo porque este locus permite una expresión consistente y ubicua del transgén integrado en él, sino porque los elementos locales de la cromatina quizás protejan a los genes endógenos cercanos de la interferencia transcripcional producida en el sitio de inserción.

9. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS: UNA NUEVA FUENTE CELULAR PARA SU USO EN TERAPIA GÉNICA.

A lo largo de esta introducción se ha abordado la situación actual de la terapia génica y las nuevas herramientas existentes para llevarla a cabo. Sin embargo, la terapia génica tiene que combinarse con la terapia celular para que ésta pueda tener aplicaciones terapéuticas eficaces. Por ello, a lo largo de este apartado se discutirán cuales son las fuentes celulares existentes que ofrecen mejores perspectivas para su uso en terapias avanzadas.

Cuando hablamos de terapia celular es imprescindible hablar de células madre. Las células madre son células indiferenciadas que tienen tres características que las hacen únicas:

- 1) Tienen la capacidad de proliferar como células indiferenciadas tanto *in vitro* como *in vivo*. Es decir, pueden autorrenovarse continuamente, generando nuevas células madre y manteniendo su propio número.
- 2) Se pueden diferenciar a distintos tipos de células somáticas, dando lugar a células maduras diferenciadas.
- 3) Pueden colonizar y originar nuevos tejidos.

Debido a estas peculiaridades el campo de la terapia con células madre comenzó a desarrollarse vertiginosamente y se iniciaron ensayos clínicos en los que se utilizaban células madre para el tratamiento de enfermedades degenerativas, cáncer o para reparar tejidos dañados o perdidos. Sin embargo, existen varios inconvenientes asociados al uso de células madre que han impedido su uso generalizado en las diferentes patologías, aunque varían dependiendo del tipo de célula madre que se utilice según se describirá a continuación.

■ Células madre embrionarias (CMEs)

Las CMEs fueron aisladas por primera vez de embriones de ratones en 1981 [415, 416], pero no fue hasta 1998 cuando Thomson consiguió crecer CMEs humanas en cultivo [417].

Derivan de células totipotentes de la masa celular interna del blastocisto, una de las fases más tempranas del embrión. Tienen la capacidad de proliferar de forma ilimitada e indiferenciada *in vitro*, un gran potencial de diferenciación, pudiendo dar lugar a células de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) [418], pueden crecer indefinidamente y en ratones pueden generar quimeras tras la inyección en blastocistos tempranos [419].

A pesar de las valiosas características que exhiben, su uso se ha visto limitado hasta el momento debido, principalmente, a dos problemas:

- 1) Los debates éticos existentes sobre el uso y manipulación de células madre embrionarias humanas (CMEhs) derivadas de oocitos humanos fertilizados.
- 2) Su trasplante en receptores alogénicos provoca las características reacciones de rechazo.

■ Células madre somáticas o células madre adultas (CMS o CMA).

Las células madre somáticas (CMS) están presentes en tejidos juveniles o adultos diferenciados. Su función natural es el mantenimiento y regeneración de las células que se pierden en los tejidos a lo largo del tiempo o por daño [420]. Existen varios tipos de células madre adultas dependiendo de los diferentes marcadores de superficie que expresen, el potencial de diferenciación y el tejido de origen. Así por ejemplo, diferenciamos entre células madre mesenquimales o estromales (CMM), células madre hematopoyéticas (CMH), células progenitoras endoteliales (CPE)..., siendo las más utilizadas para su aplicación en terapia celular las CMHs obtenidas de médula ósea y de sangre de cordón umbilical, las CMMs obtenidas de tejido adiposo y MO, y las células madre neurales aisladas de distintas áreas del cerebro y la médula espinal [421].

■ Células madre fetales (CMF)

Se trata de un grupo de células madre que se ha definido recientemente [422] y derivan del feto o de las estructuras extra-embriónicas del feto (líquido amniótico, cordón umbilical, gelatina de Wharton, membrana amniótica y placenta). Se trata de células con características intermedias entre las CMEs y las CMS, que no forman teratomas y que debido a su accesibilidad y a su alta tasa de proliferación se presentan como una buena fuente alternativa de células para su uso en medicina regenerativa.

■ Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)

Las células madre pluripotentes inducidas (del inglés *induced pluripotent stem cells*, iPSCs) son un tipo de células madre pluripotentes artificiales que derivan de tejidos adultos somáticos diferenciados [423-427]. Surgieron como una herramienta para solventar los inconvenientes que presentaba el uso y manipulación de las CMEhs derivadas de oocitos humanos fertilizados [9, 427, 428].

Aunque la tecnología de la reprogramación celular se ha desarrollado vertiginosamente en los últimos años, su origen data ya de 1953 cuando la transferencia de núcleos de blastocitos

tempranos en huevos de anfibios, *Rana pipiens*, dieron lugar a embriones normales [429]. Esta técnica, sin embargo, parecía estar limitada a su aplicación en células indiferenciadas, ya que los tejidos o células diferenciadas habían perdido la plasticidad que se requiere para la generación de estos embriones. No fue hasta 1962 cuando el Dr. Gurdon demostró que el proceso de diferenciación es reversible mediante reprogramación nuclear, transfiriendo el núcleo de células intestinales de ranas adultas en oocitos y dando lugar a cigotos que generaron embriones que dieron lugar a renacuajos [430]. Este estudio demostró que existían factores que inducían la pluripotencia y allanó el camino para la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) que culminó en la clonación de un mamífero, la oveja Dolly [431]. Tras estos descubrimientos el avance de las investigaciones se topó con varios problemas. Por un lado, estaban los problemas éticos, ya que el requerimiento de un gran número de oocitos humanos hizo imposible que se pudiera utilizar esta técnica para la terapia celular autóloga en humanos, y por otro lado, problemas técnicos, puesto que la TNCS no se ha podido utilizar con éxito para generar un línea celular pluripotente [432]. Una posible solución a estos problemas éticos y técnicos surgió de las investigaciones del grupo del Dr. Yamanaka en 2006 con el desarrollo de un protocolo para reprogramar directamente células somáticas a pluripotencia utilizando factores de transcripción definidos [135].

La generación de estas células reprogramadas abrió una ventana de esperanza al uso de células madre en enfermedades degenerativas incurables mediante terapia celular “*ex vivo*” y también para su uso en enfermedades hereditarias, al combinarse con técnicas de terapia génica. Otra aplicación es su utilidad en la investigación de patologías, ya que con ellas se pueden generar modelos de enfermedades, descubrir y estudiar genes implicados en su desarrollo y evaluar la eficacia de fármacos para su tratamiento.

Sin embargo, en la actualidad, aún existen barreras que hay que superar para utilizar las iPSC en clínica, tales como las limitaciones en su producción, los riesgos asociados a la posibilidad de generar teratomas y por último que sean capaces de generar eficazmente células funcionales *in vivo*. A pesar de sus diferentes orígenes, las CMEs y las iPSC son muy parecidas, con similares características de crecimiento, perfiles de expresión génica, modificaciones epigenéticas y potencial de desarrollo [433].

9.1. Métodos para la generación de iPSCs.

Existen múltiples métodos para la generación de iPSCs (Tabla 7). Los métodos más habituales se basan en la introducción de los factores de transcripción utilizando diferentes tipos de vectores virales, entre los que se incluyen retrovirus [9], lentivirus [434], adenovirus [435] y virus adenoasociados (AAVs) [436], y también mediante transfecciones con plásmidos episomales [437], transposones [438], ARNm o proteínas recombinantes [439]. Actualmente se están desarrollando más métodos alternativos a la utilización de vectores virales, además de los recién expuestos, como por ejemplo, la utilización de microARNs [440] o el medio condicionado de células madre [441, 442], aunque estos métodos deben ser aún validados. A continuación se explicarán en detalle los distintos métodos de reprogramación reportados hasta el momento.

9.1.1. Reprogramación por factores de transcripción exógenos.

■ Aproximación utilizando ácidos nucleicos.

Como ya se ha mencionado, Yamanaka y Takahashi consiguieron generar las primeras células madre inducidas a pluripotencia (iPSC) infectando fibroblastos de ratón con retrovirus que expresaban cuatro factores de transcripción denominados *Oct4*, *Klf4*, *Sox2* y *c-Myc* (OKSM). Así pues, las estrategias iniciales para introducir los factores OKSM se basaron en la introducción a través de vectores retrovirales [9, 135, 425, 443, 444] o con vectores lentivirales inducibles [435, 445-448]. Sin embargo, la utilización de estos métodos presenta varios problemas asociados como es el de integración genómica y riesgo de mutagénesis insercional [449].

Para evitar estos problemas se han utilizado vectores con secuencias como las loxP, que permitan la escisión tras su integración en el genoma [450-453] y también se han desarrollado técnicas que no impliquen la utilización de sistemas integrativos, tales como el uso de vectores virales no integrativos [435], transfección transitoria con plásmidos que expresen ectópicamente estos factores [428, 439, 454], o la utilización de sistemas basados en transposones [438, 455]. Otra de las estrategias que se están aplicando con éxito para la expresión de los genes de reprogramación es la administración repetida de ARNm sintéticos modificados [439]. Actualmente, la alternativa a virus integrativos que se está aplicando con más éxito para reprogramar células es la utilización de los virus Sendai no integrativos [456], ya que este método no integrativo presenta una eficacia similar a la obtenida con vectores integrativos.

■ Aproximación no basada en ácidos nucleicos.

En 2009, Ding y colaboradores, demostraron que era posible reprogramar fibroblastos embrionarios de ratón con transducción directa de proteínas OKSM que contenían un dominio de transducción proteico de poliarginina fusionado al extremo C Terminal, junto con la exposición de las células a ácido valproico, un inhibidor de la histona deacetilasa [457] y así generar células pluripotentes con capacidad de formar quimeras y contribuir a la línea germinal. También se generaron iPSCs de fibroblastos fetales humanos cultivándolos con proteínas OKSM recombinantes que poseían un dominio de transducción consistente en un transactivador de transcripción del VIH [441]. Sin embargo, la reprogramación directa utilizando proteínas presenta como inconvenientes la corta vida media de los factores, por lo que se necesitan múltiples aplicaciones de los factores, y la dificultad de purificar las proteínas [449].

Recientemente se ha demostrado que una única transferencia de extractos de proteínas de células madre embrionarias por permeabilización reversible, puede dar lugar a iPSCs a partir de fibroblastos adultos cardíacos de ratón [458].

9.1.2. Reprogramación por reclutamiento autónomo no celular de los factores endógenos OKSM.

La reprogramación autónoma no celular ofrece una alternativa a los protocolos que utilizan ácidos nucleicos y consiste en la adición de factores extrínsecos que son añadidos a las células y que se encuentran en el medio de cultivo que ha estado en contacto con células madre. Estos factores

desencadenan el reclutamiento de genes pluripotentes endógenos (*Klf4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Oct4* y *Nanog*). De este modo se evitan problemas como la mutagénesis insercional.

Estos métodos se basan en el conocimiento de que el nicho celular influye notoriamente en la célula madre, ayudando a mantenerlas en un estado quiescente y contribuyendo a su reprogramación temporal, necesaria para generar los tipos celulares específicos durante la histogénesis. Varias investigaciones han demostrado la influencia del microambiente en la reprogramación de células madre dentro del contexto de un tejido particular o en la transdiferenciación de una línea somática en otra [459], sin embargo, saber si éstas pueden ser reprogramadas a una línea embrionaria temprana sigue siendo una pregunta abierta. Aún no se conoce demasiado acerca de la efectividad de este método, por lo que la identificación de los factores que median la reprogramación autónoma no celular sería la clave para incrementar la eficiencia de este tipo de reprogramación.

Método de reprogramación	Factores de reprogramación	Tipo celular	Eficiencia (%)	Integración en el genoma	Referencias
Transducción Retroviral	OSKM/ OSKM+VPA/ OSK/ OSK+VPA/ OS+VPA	Fibroblastos de ratón, fibroblastos humanos, células madre neurales, queratinocitos, células sanguíneas, células adiposas, células de hígado	0,001-1	Sí	[9, 135, 423, 460]
Transducción lentiviral	OSKM/OSNL	Fibroblastos humanos y queratinocitos	0,1-1,1	Sí	[427, 461-463]
Lentiviral inducible	OSKM/OSKMN	Fibroblastos humanos, queratinocitos, células sanguíneas, melanocitos y células β	0,1-2	Sí	[447, 464]
Transducción con adenovirus	OSKM	Fibroblastos, hepatocitos de ratón	~0,001	No	[435, 457]
Transfección de plásmidos	OSK/ OSNL	Fibroblastos	~0,001	No	[454, 465]
Vector escindible	Lentiviral loxP/ transposón	Fibroblastos	~0,1-1	No	[438, 462]
No ADN	Proteínas purificadas (OSKM)/ virus Sendai (OSKM), ARNm (OSKM, OSKML+VPA)/ microARN (miR-200c, miR-302s y miR-369s)	Fibroblastos, células adiposas estromales, fibroblastos dérmicos	~0,001-4	No	[439, 441, 456, 457, 466]
Fusión celular	Fusión directa con CMEs	Timocitos adultos, fibroblastos humanos	~0,001	No	[467]
Extracto celular	ESC+extracto celular/ Sólo extracto celular/ Extracto celular CMEs+inhibidores de la metilación de ADN	Fibroblastos humanos de neonatos, fibroblastos humanos fetales irradiados	0,001-0,017	No	[441, 442]

Tabla 7. Resumen de los métodos actuales de reprogramación y los tipos celulares utilizados. O: *Oct4*, S: *Sox2*, K: *Klf4*, M: *c-Myc*, N: *NANOG*, L: *Lin-28* y VPA: ácido valproico.

9.2. Fuentes celulares para la generación de iPSCs.

Para lograr el éxito en la generación de iPSCs otro factor a tener en cuenta, además de conseguir un nivel adecuado de expresión de los factores de reprogramación [468], es que la fuente celular de la que partimos para realizar la reprogramación sea óptima para la recepción de los factores de reprogramación y de fácil accesibilidad en el sujeto.

Debido a esto uno de los tipos celulares más utilizados para llevar a cabo la reprogramación celular han sido los fibroblastos [375, 425-427, 452, 456, 469-471], pero también se han obtenido iPSCs de células de hígado, células β pancreáticas, células maduras B [433], células mononucleadas de sangre periférica [472] o de médula ósea [473], así como de células CD34⁺ [474]. A pesar de que, en teoría, independientemente de la línea celular de partida las células iPSCs generadas deberían tener el mismo estado de pluripotencia, y por lo tanto, la misma capacidad de generar cualquier tipo celular, aunque difiera mucho del de partida; existen estudios que señalan que existen diferencias entre el estado de metilación entre las CMEhs y las hiPSCs y que esto puede ser debido a una memoria epigenética que depende del tipo celular original [475-479]. Otros grupos indican que el diferente estado de metilación de CMEhs e iPSCs se debe únicamente a diferencias intrínsecas entre clones de la misma línea o que son dependientes del método de reprogramación utilizado [480-482]. Es decir, aún no existe una conclusión clara acerca de la existencia de una memoria epigenética en las iPSCs y si el tipo celular de partida favorece una diferenciación posterior hacia un tipo determinado de célula. Por ello, para la elección de la fuente celular los principales aspectos a tener en cuenta hasta el momento son aquellos que nos permitan obtener y manipular la célula sin generar perjuicios ni en ésta, ni en el individuo.

10. iPSCs y TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA: FUTURAS APLICACIONES TERAPEÚTICAS.

Con la entrada de las iPSCs en el escenario científico se abrieron nuevas vías de investigación en diversos ámbitos. Uno de ellos fue su utilización en combinación con técnicas de terapia génica, ya sea mediante terapia génica convencional [136, 483] o dirigida utilizando las nucleasas mencionadas anteriormente.

La terapia génica convencional ha sido una opción para tratar enfermedades en las que se corregían las mutaciones que las originaban [390]. Sin embargo, como ya se ha mencionado, la principal desventaja de este método es la integración del ADN exógeno no dirigida [206, 390, 484, 485]. Por ello, la terapia génica dirigida se presenta como una alternativa que elude este problema y, combinada con iPSCs, supone una propuesta atractiva como terapia, ya que se podría corregir una mutación en una iPSC derivada de células somáticas del paciente y posteriormente diferenciar éstas a un tipo celular específico y ser trasplantadas, de nuevo, en el paciente (Fig. 14).

Los principales usos que se pueden obtener de la generación de las iPSCs en combinación con técnicas de terapia génica serían:

- Corrección génica de una mutación concreta o mediante la inserción génica dirigida de un ADNc, ya sea en un locus determinado (generación de un *knock in*, KI) o en un sitio seguro del genoma. Hasta el momento se han llevado a cabo varios protocolos de terapia génica dirigida en hiPSC [289, 290] que han demostrado la capacidad de los ZFN para modificar el genoma de forma controlada. Este hecho, junto con los estudios que muestran la posibilidad de generar iPSCs de pacientes [377], su diferenciación y su capacidad de curar una enfermedad en ratones [486] hacen pensar en la posibilidad de desarrollar que terapias específicas para los pacientes en un futuro próximo.

- Modelización de patologías humanas, bien mediante la eliminación de un gen implicado en el desarrollo de la patología (generación de KO) o mediante creación de mutaciones específicas desencadenantes de la enfermedad.

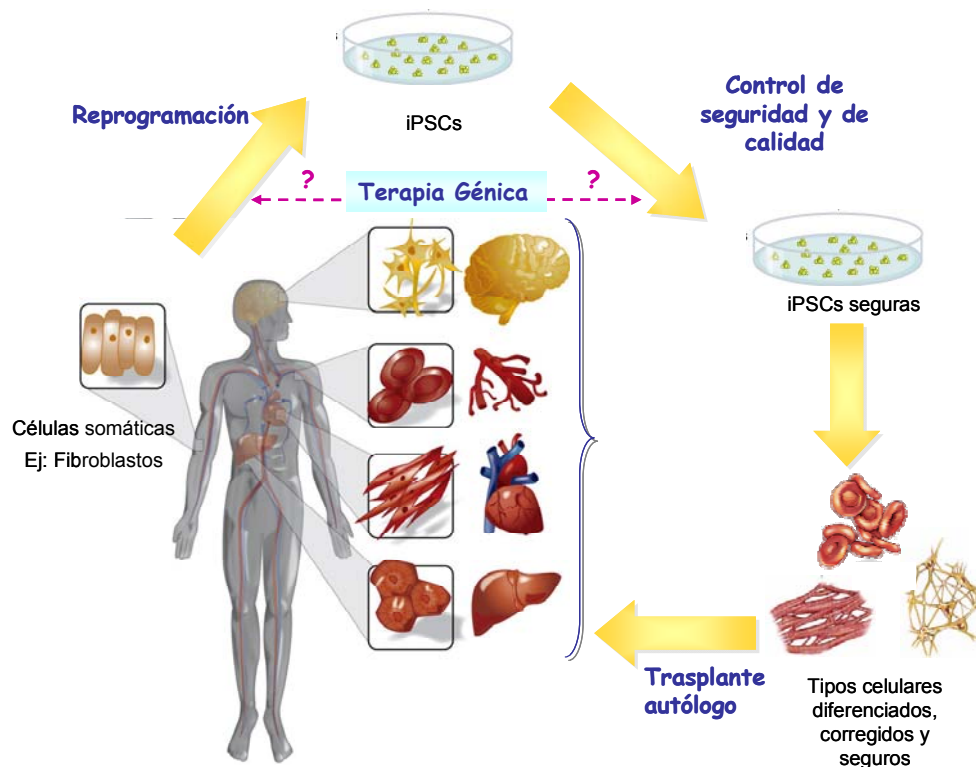


Figura 14. Esquema de la aplicación en terapia de la tecnología de iPSCs combinada con terapia génica. Es importante destacar que la corrección del defecto genético en la célula se puede realizar antes o después de la generación de iPSC, según convenga en cada patología.

Como se ha observado estas células nos abren múltiples posibilidades para ser utilizadas en terapia, aunque para que puedan ser aplicadas en clínica hay que tener en cuenta varios factores que deben ser resueltos:

- El primero de ellos sería controlar todos los componentes implicados en la reprogramación (vector, factores de reprogramación, factores de crecimiento/diferenciación y el estroma utilizado para crecer las iPSCs) para que este proceso sea lo más seguro posible y se evite el que pueda incrementar el riesgo de desarrollo de cáncer.
- Otro factor de riesgo es que, al igual que las CMEs, las iPSC tienen predisposición a formar teratomas. Por ello es muy importante desarrollar métodos que aseguren la eliminación de las células iPSCs indiferenciadas remanentes en una muestra de células diferenciadas que se quieran trasplantar al paciente.
- También existen estudios que revelan que las iPSCs poseen más alteraciones genómicas, tanto a nivel cromosómico, subcromosómico, como de base única, que las CMEs y que las células originales de las que derivan [487-489].

Por ello, antes de poder utilizar estas células para ser infundidas en un paciente deben realizarse estudios más exhaustivos, tanto a nivel genómico y epigenómico que nos ayuden a comprender y mejorar los procesos de reprogramación y diferenciación de las iPSCs. De este modo se

podrá mejorar la función de las células derivadas de las iPSC, en particular para la generación de las células del sistema hematopoyético, que permitan el tratamiento eficaz de las patologías de este sistema.

A pesar de estos inconvenientes, estas células están demostrando tener un gran potencial para su utilización en el estudio y tratamiento de diversas patologías

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis ha sido el desarrollo de nuevos modelos experimentales que reproduzcan la aplasia medular característica de los pacientes con anemia de Fanconi (AF), así como el desarrollo de nuevas aproximaciones para mejorar el tratamiento del problema hematológico de estos pacientes.

Así pues, los principales objetivos propuestos en este trabajo han sido:

1) Desarrollo de un modelo de ratón humanizado que reproduzca el fallo de médula ósea observado en los pacientes con AF, y que por tanto sirva como instrumento eficaz para la investigación de su etiología y el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas, celulares y génicas de la aplasia medular característica de la AF.

Para ello se plantearon las siguientes metas:

- 1.1. Diseño y validación de vectores lentivirales que expresen de forma constitutiva shARNs (VL:shARNs) para reducir la expresión del gen *hFANCA* y así generar células con fenotipo de AF.
- 1.2. Generación de progenitores hematopoyéticos humanos con fenotipo de AF mediante la transducción de PHs de donantes sanos con el vector VL:shFANCA.
- 1.3. Desarrollo *in vivo* de un modelo humanizado de AF, generado mediante el trasplante de progenitores hematopoyéticos interferidos para el gen *hFANCA*.
- 1.4. Estudio de la eficacia de la terapia génica en el modelo de ratón humanizado de *hFANCA*, tanto con el vector original desarrollado anteriormente por nuestro laboratorio para este propósito, como con una versión mutada de éste.

2) Desarrollo de una nueva aproximación de terapia génica de la AF basada en técnicas de edición génica por recombinación homóloga y reprogramación de células de pacientes como método de generar progenitores hematopoyéticos corregidos del defecto genético.

Los subobjetivos propuestos para su consecución fueron:

- 2.1. Evaluación de la posibilidad de llevar a cabo protocolos de recombinación homóloga en células de AF.
- 2.2. Generación y validación de un vector lentiviral no integrativo para corregir mediante RH fibroblastos de pacientes AF-A mediante la inserción del gen *hFANCA* el locus *AAVS1*.
- 2.3. Corrección a nivel molecular y fenotípico de fibroblastos derivados de pacientes de AF-A mediante editado génico en el sitio seguro *AAVS1*.
- 2.4. Generación de células inducidas pluripotentes (iPSCs) sanas a partir de los fibroblastos AF-A editados genéticamente, utilizando un vector de reprogramación escindible.
- 2.5. Papel de la inmortalización con *hTERT* de las células derivadas de pacientes de AF-A en los procesos de recombinación homóloga y reprogramación.
- 2.6. Diferenciación de las iPSCs AF-A editadas genéticamente hacia progenitores hematopoyéticos, y evaluación de su corrección.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELOS ANIMALES.

A lo largo de este trabajo se han utilizado ratones de la cepa NOD.CB17-PrkdcScid/J (NOD/SCID), deficientes en receptores Fc, función del complemento y funcionalidad de células B y T [490] y ratones de la cepa NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) deficientes en linfocitos maduros T y B, en la expresión de la cadena IL2R-γ, en la producción de inmunoglobulinas séricas detectables y en la actividad de las células NK [491, 492]. Todos ellos se obtuvieron del laboratorio Jackson (Bar Harbor, Maine, EE.UU.)

Los ratones se mantuvieron en el Servicio de Animalario del CIEMAT (Número de Registro ES280790000183) durante el procedimiento experimental en microaisladores de tipo II L (con 6 animales como máximo en cada uno) en racks ventilados individualmente, con 25 renovaciones de aire por hora en cada jaula, con lecho de viruta autoclavada troceada de maderas blandas tratada térmicamente y en condiciones controladas de aire filtrado a través de filtros HEPA en las salas, humedad relativa (55±10%) y temperatura (20±2°C), con ciclos de luz/oscuridad de 12 h (7:00-19:00), alimentación *ad libitum* (Harlan Global Diet 2918 irradiada con 25 KGy rayos gamma) y agua de bebida irradiada con luz ultravioleta con, al menos, 4 partes por millón de cloro residual libre, filtrada por 50 μm y autoclavada. El estado microbiológico de los animales fue controlado sanitariamente siguiendo los criterios de FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) y no se reveló la presencia de patógenos. El estado de salud de los animales se controló rutinariamente mediante análisis en animales centinelas.

El manejo y manipulación de los animales se realizó en condiciones estériles (material tratado o autoclavado, cabinas de flujo laminar, etc.). Con estos ratones se llevaron cabo estudios de formación de teratomas (machos de entre 6-8 semanas) y análisis del comportamiento de células madre hematopoyéticas humanas trasplantadas (hembras de ente 6-8 semanas). En el caso del trasplante con células hematopoyéticas, antes de dicho trasplante, los ratones, de entre 6 y 8 semanas de edad, recibieron una irradiación de 2,2 Gy con el equipo de rayos-X MG324 (Philips), a 300 kV. y 10 mA, con una tasa de dosis de 1,03 Gy/min. Estudios previos han demostrado que dicha dosis de irradiación en animales NOD/SCID es suficiente para permitir el injerto de células hematopoyéticas humanas [493, 494].

Todos los procedimientos se realizan de acuerdo a la legislación y regulaciones Europeas y Españolas (Convenio europeo ETS 1 2 3, relativo a la protección de vertebrados usados en experimentación y otros fines científicos, RD 1201/2005 sobre uso y protección de animales usados en investigación y Ley 32/ 2007 relativa a bienestar animal). Los procedimientos experimentales son aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal del centro conforme a los criterios internos y externos relativos a bioseguridad y bioética.

Asimismo, todos los procedimientos de irradiación siguieron los criterios y normas de Protección Radiológica que recoge la legislación vigente (Reglamento sobre Instalaciones Nucleares y Radiactivas Real Decreto 1836/1999 de 3 de Diciembre; Real Decreto 35/2008, de 18 de enero por el que se modifica el anterior; Reglamento sobre Protección Sanitaria contra Radiaciones Ionizantes Real Decreto 783/2001 de 6 de Julio).

2. TIPOS CELULARES UTILIZADOS.

- ✚ **Células 293T:** Se trata de una línea celular epitelial de riñón humano (*Human Embryonic Kidney*) en la que se insertó el gen sensible a la temperatura que codifica el antígeno T del SV40, de manera que presenta una mayor eficacia para ser transfectado (Código ATCC: CRL-11268). La presencia de esta secuencia permite la replicación episomal de plásmidos que contengan el origen de replicación y la región promotora temprana del SV40. Se trata de una línea celular con alta capacidad de transfección por lo que es utilizada habitualmente para la producción de vectores virales.
- ✚ **Células HT1080:** Células de fibrosarcoma epitelial humano (Código ATCC: CCL-121). Se ha utilizado para la titulación de sobrenadantes lentivirales.
- ✚ **Células MRC5:** Línea diploide de fibroblastos de pulmón humano (Código ATCC: CCL 171).
- ✚ **Líneas celulares linfoblastoides (LCLs):** Líneas linfoblastoides humanas generadas mediante la transformación de células B humanas de sangre periférica con el virus Epstein-Barr (EBV), que activa la proliferación de células B. Estas células poseen un cariotipo diploide normal, están inmortalizadas y no son tumorigénicas. Se utilizaron LCLs derivadas de donantes sanos (D.S.) y de tres pacientes diferentes de AF del grupo de complementación A (AF-A 8, AF-A 88 y AF-A 56)².
- ✚ **Células madre/progenitoras derivadas de sangre de cordón umbilical:** Se trata de células positivas para el marcador de superficie CD34, una molécula con posible implicación en adhesión de las células madre a la matriz extracelular de la MO o a las células estromales durante la hematopoyesis temprana [495-498] y que se utiliza como marcador de células progenitoras humanas.
- ✚ **Células derivadas de médula ósea de pacientes:** Se trata de la población de células mononucleas obtenidas de la médula ósea de pacientes de AF (AF-82, AF-664¹).
- ✚ **Fibroblastos humanos:** Procedentes de donantes sanos y derivados de diferentes pacientes de AF pertenecientes al grupo A de complementación (AF-5, AF-123, AF-664 y AF-52¹).
- ✚ **Líneas de células madre embrionarias humanas (CMEhs):** Se utilizaron dos líneas humanas de CMEs como controles para los diferentes experimentos realizados.
 - **H9:** Es una de las líneas de CMEhs más ampliamente distribuida y utilizada en investigación de entre las 78 líneas que se encuentran en el registro de células madre embrionarias del NIH (*NIH Human Embryonic Stem Cell Registry*, <http://stemcells.nih.gov/research/registry/>).
 - **ES4:** Línea de CMEh generada por Aran y col. en el banco de Células Madre de Barcelona en el Centro de Medicina Regenerativa en Barcelona [499]
- ✚ **Fibroblastos humanos de prepucio, línea HFF-1 (del inglés *human foreskin fibroblasts*):** Esta línea fue establecida por la ATCC en 2003 de una mezcla de fibroblastos de prepucio humano de dos individuos recién nacidos (ATCC Nº catálogo: SCRC-1041). Estas células se utilizaron como

² La codificación utilizada en todos los pacientes con Anemia de Fanconi está obtenida del registro Español de Anemia de Fanconi.

estroma para favorecer el crecimiento de las células madre embrionarias (CMEs) y mantenerlas en estado indiferenciado. Para ello se irradiaron con 45 Gy antes de su utilización. En este trabajo estas células se utilizan como estroma para el crecimiento de células madre inducidas a pluripotencia (iPSC).

- 🔗 **Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, inglés *induced pluripotent stem cells*).** Se generaron diferentes clones de células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos de pacientes de AF previamente corregidos mediante terapia génica dirigida, según se detalla en el apartado 2 de la sección de resultados.

En la tabla 8 se muestra un resumen de los diferentes tipos celulares utilizados, sus condiciones de cultivo, así como del uso que de las mismas se ha realizado para el desarrollo del presente trabajo.

Tipos celulares	Medio de crecimiento	Tipo de crecimiento	Condiciones de crecimiento	Uso
293T	DMEM (Invitrogen) + 10% FBS (Biowhitaker) y 0,5 % penicilina/estreptomicina (Gibco).	Adherente	Normoxia 37°C, 21% O ₂ y al 95% HR	Producción de vectores virales
HT1080	DMEM (Invitrogen) + 10% FBS (Biowhitaker) y 0,5 % penicilina/estreptomicina (Gibco).	Adherente	Normoxia 37°C, 21% O ₂ y al 95% HR	Titulación de vectores virales
MRC5	DMEM (Invitrogen) + 10% FBS (Biowhitaker) y 0,5 % penicilina/estreptomicina (Gibco).	Adherente	Normoxia 37°C, 21% O ₂ y al 95% HR	Experimentos con VL:shARNs
Células Madre/progenitoras derivadas de sangre de cordón (CD34⁺)	IMDM (<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> , Gibco)+ 20% FBS (Biowhitaker)+ 1% penicilina/estreptomicina (Gibco)+ 100 ng/mL de Trombopoyetina humana (TPO, EurobioSciences)+ 100 ng/ml de ligando para receptores Flt3 (Flt3 ligand, EurobioSciences) + 300 ng/ml de factor de células madre humano (<i>human stem cell factor</i> , hSCF, EurobioSciences).	Suspensión	Normoxia 37°C, 21% O ₂ y al 95% HR	Experimentos con VL:shARNs
LCLs	Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, Invitrogen) + 10 % FBS (Biowhitaker) y 0,5 % penicilina/estreptomicina (Gibco).	Suspensión	Normoxia 37°C, 21% O ₂ y al 95% HR	Experimentos de RH
Fibroblastos primarios de piel pacientes	DMEM (Invitrogen) + 20% FBS (Biowhitaker) y 1% penicilina/estreptomicina (Gibco).	Adherente	Hipoxia 37°C, 5% O ₂ y al 95% HR	Experimentos de RH
Células madre embrionarias humanas (CMEhs)	Medio CMEs: DMEM-KO (Gibco), aminoácidos no esenciales (NEEA, Lonza, Biowhitaker), 2 mM glutamax (Gibco), 0,5 % solución penicilina/estreptomicina (Gibco), 10% Suero KO de reemplazo (Gibco), 50 µM β-Mercaptoetanol (Gibco, 31350-010) y 10 ng/ml hb-FGF (0,1mg/mL) (Prepotech).	Adherente sobre capa de HFF-1 (<i>feeder</i>)	Normoxia 37°C, 21% O ₂ y al 95% HR	Como control en los experimentos de reprogramación
Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)	Medio CMEs: Igual al descrito para CMEhs	Adherente sobre capa de HFF-1 (<i>feeder</i>)	Hipoxia 37°C, 5% O ₂ y al 95% HR	Diferenciación a células hematopoyéticas
HFF-1	DMEM (Invitrogen) + 10% suero Hyclone (Biowhitaker) + 0,5 % penicilina/estreptomicina (Gibco).	Adherente	Normoxia 37°C, 21% O ₂ y al 95% HR	Actuar como capa de alimentación de CMEs e iPSCs

Tabla 8. Cultivos celulares. Resumen de los tipos celulares utilizados en este proyecto y sus condiciones de cultivo. FBS: Suero bovino fetal. HR: Humedad relativa.

2.1. Purificación de células CD34⁺ de sangre de cordón umbilical.

Para la obtención de progenitores hematopoyéticos se utilizó sangre de cordón umbilical (cedida por el Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid) que se procesó durante las 12

horas posteriores al parto. Estas muestras procedían de cordones no aptos para banco y tras el consentimiento informado de los donantes. El primer paso para la purificación fue la centrifugación de la muestra en gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque (1,077 g/mL; Pharmacia Biotech) a 524g durante 30 min sin freno. De este modo, en la interfase formada entre el suero y el ficoll, se obtuvieron las células mononucleadas. Tras dos lavados con PBE (PBS, 0,1 % BSA, EDTA 2,5 mM), las células se resuspendieron en este mismo tampón y se sometieron a separación inmunomagnética utilizando el kit comercial CliniMACS para purificar células progenitoras CD34⁺ (Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. Tras la purificación, se analizó la pureza de las células CD34⁺ obtenidas, para lo cual se marcó una alícuota de las células con los anticuerpos antiCD34-PE (antiphycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD34⁺, BD) durante 30 min a 4°C, tras lo cual se lavaron con PBA (PBS, 0,1 % BSA, Azida sódica) y se analizaron utilizando un citómetro EPICS ELITE-ESP (Coulter). En todos los casos, la pureza obtenida fue superior al 90%.

3. VECTORES.

3.1. Vectores Lentivirales.

3.1.1. Descripción de vectores lentivirales utilizados.

■ Vectores utilizados en la generación de un modelo humanizado de AF mediante VL:shARN.

- **LVTHM:** Descrito por Szulc y col. [182]. Es un vector que consta del operador tetO (permitiría la regulación de la expresión del casete que contiene el shARN en caso de que fuera necesario), el promotor H1 (promotor de la polimerasa III que dirige la expresión del shARN), un sitio de clonaje para la introducción del shARN correspondiente (entre las enzimas *Clal* y *MluI*), el promotor humano EF-1 α (*Elongation factor 1 α*), que dirige la expresión de la proteína verde fluorescente (del inglés *Enhancer Green Fluorescent Protein*, eGFP) y la secuencia Wpre (el elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis B de la marmota que actúa como estabilizador del mensajero [228, 500])(Fig. 15).

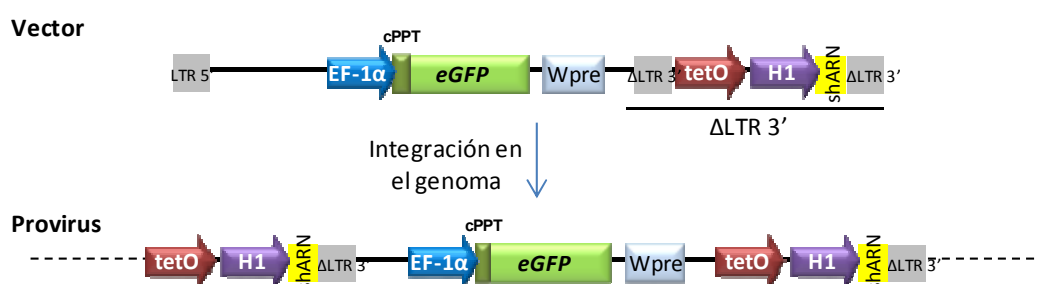


Figura 15. Esquema del vector LVTHM que expresa el shARN. El casete de expresión que contiene el tet O (Operón Tet), el shARN y el promotor H1 está situado en la región U3 de la LTR3'. Tras la transcripción reversa, el provirus integrado presentará dos copias del shARN. Además el vector contiene el gen marcador eGFP (proteína verde fluorescente) que se expresa bajo el promotor EF-1 α (factor de elongación 1 α) y la secuencia Wpre.

- **VL:PGK.FANCA.Wpre*:** Vector elaborado por González-Murillo y col. [6] y aprobado como medicamento huérfano para el tratamiento de la AF-A [501]. Se trata de un vector lentiviral donde la expresión del gen *FANCA* humano está dirigido por el promotor interno PGK (fosfoglicerato quinasa) de origen humano. También posee la secuencia Wpre mutada

(Wpre*) que favorece la estabilidad del ARNm pero que al estar mutada en la región codificante no expresa la proteína X, relacionada en algún trabajo con el desarrollo de hepatocarcinomas [502, 503] (Fig. 16).



Figura 16. Esqueleto del vector PGK.hFANCA.WPRE* (forma no integrada). CMV: promotor del citomegalovirus. cPPT: Región central del tracto de polipurina. PGK: Promotor fosfoglicerato quinasa. hFANCA: gen humano FANCA.

■ Vectores utilizados en la generación de iPSCs derivadas de fibroblastos AF-A corregidos mediante terapia génica dirigida.

1) Vectores lentivirales producidos como vectores lentivirales deficientes en integración (VLDI).

- **pCCL.sin.cPPT.AAVS1.PGK.GFP.pA.Wpre:** Esta construcción actuará como donador (Lombardo y col. [279]). Contiene los brazos de homología del locus AAVS1 para su correcta inserción en este sitio por RH y el gen *eGFP* bajo la expresión del promotor PGK, denominado en este trabajo como VLDI:RH-GFP. Estas siglas hacen referencia a que se trata de un vector lentiviral deficiente en integrasa (VLDI) (Fig. 17).



Figura 17. Esqueleto del vector pCCL.sin.cPPT.AAVS1.PGK.GFP.pA.Wpre (forma no integrada). PGK: Promotor fosfoglicerato quinasa. eGFP: ADNc verde fluorescente.

- **pCCL.sin.cPPT.AAVS1.loxP.SA.GFP.pA.loxP.PGK.FANCA.pA.Wpre:** Vector donador que fue generado en este trabajo utilizando elementos de los esqueletos de los vectores pCCL.PGK.FANCA.Wpre* [6] y pCCLsin.cPPT.AAVS1.2A.GFP.pA [7]. Contiene los brazos de homología del locus AAVS1, el gen marcador *eGFP* sin promotor, aunque se introdujo el aceptor de *splicing* antes de dicho gen, y el ADNc del gen *hFANCA* bajo el control del promotor PGK. En este trabajo lo hemos denominado VLDI:RH-FANCA (Fig. 18).



Figura 18. Esqueleto del vector pCCL.sin.cPPT.AAVS1.loxP.SA.GFP.pA.loxP.PGK.FANCA.pA.Wpre (forma no integrada). eGFP: proteína verde fluorescente, PGK: Promotor fosfoglicerato quinasa, hFANCA: ADNc del gen humano FANCA.

- **pLM.CMV.Cherry.2A.Cre** [504]: Vector adquirido de Addgene. Expresa la Cre Recombinasa que es capaz de escindir genes del genoma situados entre las secuencias loxP y el gen marcador Cherry cuya expresión nos permitirá localizar las células transducidas con el vector (Fig. 19).



Figura 19. Esqueleto del vector pLM.CMV.Cherry.2A.Cre (forma no integrada). CMV: Promotor del citomegalovirus. mCherry: ADNc de ratón del gen *Cherry*. IRES: Sitio interno de entrada del ribosoma (del inglés, *Internal Ribosome Entry Site*). CreR: ADNc de la proteína CreRecombinasa.

2) Vectores lentivirales producidos como vectores lentivirales competentes en integración (VLCl).

- **pLox.TERT.iRES.TK** [505]: Vector adquirido de Addgene. Expresa el gen de la subunidad transcriptasa reversa (TERT) de la enzima telomerasa humana y el gen de selección Timidina quinasa (TK), flanqueados, ambos, por la región loxP una vez que el provirus se integre en el genoma (Fig. 20). Este último gen nos permitirá realizar una selección negativa con ganciclovir de las células en las que no se haya escindido el casete de expresión tras la actuación de la CreRecombinasa.



Figura 20. Esqueleto del vector pLox.TERT.iRES.TK (forma no integrada). CMV: Promotor del citomegalovirus. hTERT: ADNc de la subunidad TERT de la telomerasa humana. IRES: Sitio interno de entrada al ribosoma (del inglés, *Internal Ribosome Entry Site*). TK: ADNc del gen de la Timidina quinasa.

- **pHAGE.STEMCCA.loxP**: Vector lentiviral de reprogramación descrito previamente por el grupo de Mostoslavsky [506] y que actuará como vector de reprogramación, ya que contiene ADNc codificantes de ratón de los genes *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4* expresados a partir del promotor EF1α y las regiones loxP que permitirán su subsecuente escisión (Fig. 21).



Figura 21. Esqueleto del vector pHAGE.STEMCCA.LoxP (forma no integrada). Contiene el ADNc de ratón correspondiente a los genes de reprogramación *Oct4*, *Klf4*, *Sox2*, *CMyc*. EF1α: Promotor del Factor de Elongación 1α. IRES: Sitio interno de entrada al ribosoma. E2A: péptido 2A autoescindible obtenido del virus de la rinitis equina A. F2A: Péptido 2A autoescindible obtenido del virus de la enfermedad del pie y la boca (virus Coxsackie).

3) Vectores adenovirales.

- **AdV5/35 ZFN**: Se trata de un vector adenoviral AdV5/35 que expresa, de forma transitoria y bajo el promotor CMV, la pareja de ZFNs que tienen como diana el intrón 1 del gen PPP1R12C tal y como fue previamente descrito [289]. Este par de ZFN contiene el obligado heterodímero del dominio FokI [356].

3.1.2. Generación de sobrenadantes lentivirales utilizando células 293T.

Para la generación de sobrenadantes se han utilizado vectores lentivirales (VL) autoinactivantes (SIN) de segunda y tercera generación [228]. En función del objetivo con el que se utilizaron se han producido como competentes o deficientes en integración.

En todos los casos, los sobrenadantes lentivirales se produjeron mediante cotransfección transitoria de tres (2ª generación) o cuatro (3ª generación) plásmidos en células 293T. Estos plásmidos son: un plásmido de transferencia, un plásmido de la envuelta y uno o dos plásmidos empaquetadores dependiendo de si se trata de un vector lentiviral de segunda o tercera generación (características explicadas en el apartado 5.1.1 de la introducción). Dependiendo del tipo de vector que se quiere producir se han utilizado los siguientes protocolos:

- 1) Para la producción de vectores lentivirales competentes en integración (VLCl ó ICLV, del inglés *integrative competitive lentiviral vector*) (tabla 9) se sembraron $4,5 \times 10^6$ células 293T en placas

p100 (10cm de diámetro) previamente tratadas con gelatina 0,1%. Al cabo de 24 horas, cuando las células alcanzaron el 60-70% de confluencia, se realizó la cotransfección del plásmido de transferencia que se desea vectorizar en cada caso, los plásmidos de empaquetamiento (pCDNL-BH para 2ª generación o pMD.Lg/RRE y pRSV-REV para 3ª generación) y el plásmido que codifica para la envuelta viral pMD2.VSV-G (proteína G del virus de la estomatitis vesicular) en las siguientes cantidades: 10/5/5 µg de ADN para 2ª generación ó 10/5/5/5 µg de ADN para 3ª generación, por placa p100 (Corning), utilizando el agente de transfección Eugene 6 (Promega), un agente de transfección basado en la introducción del ADN a través de lípidos. La mezcla de transfección fue añadida a las células 293T y, al día siguiente, el medio de cultivo fue reemplazado por medio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 0,5% de antibiótico (penicilina 10,0 U/mL - estreptomycin 10,0 mg/mL, Gibco). A las 24 horas tras el cambio de medio, se recogieron los sobrenadantes y se filtraron mediante un filtro de 0,45µm de poro. La envuelta VSV-G resiste la ultracentrifugación por lo que los sobrenadantes se centrifugaron a 52255 Gs (G=factor centrifugo) en una centrífuga Beckman Coulter Optima L-90K refrigerada durante dos horas y a una temperatura de 4°C, con el objetivo de concentrar 100 veces las partículas virales. Los SNs resuspendidos en 100 µl de PBS 1X o medio DMEM sin suplementar se congelaron y almacenaron a -80°C.

Tipo de plásmido		Nombre	Particularidades
Plásmido de transferencia	2ª Generación	pLVTHM [181]	Expresa constitutivamente eGFP
		pLVTHM. sh6FANCA	Expresa eGFP y sh6FANCA ARN
		pLVTHM. sh7FANCA	Expresa eGFP y sh7FANCA ARN
		pLVTHM. sh8FANCA	Expresa eGFP y sh8FANCA ARN
		pLVTHM. shcontrol	Expresa eGFP y shcontrol ARN
	3ª Generación	PGK.FANCA.Wpre*[6]	VL que expresa el gen humano FANCA
		PGK.FANCAsh7ARN2mut.Wpre*	VL que expresa el gen humano FANCA con dos mutaciones silentes
		PGK.FANCAsh7ARN3mut.Wpre*	VL que expresa el gen humano FANCA con tres mutaciones silentes
		PGK.IN	VL que expresa la proteína Neo (control)
		pHAGE.STEMCCA.loxP [506]	VL de reprogramación
	pLox.TERT.ires.TK [505]	VL que expresa la subunidad TERT humana	
Plásmidos empaquetadores	2ª Generación	pCDNL-BH [507]	Contiene los genes <i>Gag/Pol, Tat, Rev</i>
	3ª Generación	pMDLg/pRRE [508]	Contiene los genes <i>gag</i> y <i>pol</i>
		pRSV-REV [508]	Contiene el gen <i>rev</i>
Plásmido de la envuelta		pMD2-VSV-G [508]	Expresa la glicoproteína G del VSV (VSVG)

Tabla 9. Plásmidos utilizados para la generación de vectores lentivirales competentes en integración.

- 2) En el caso de vectores lentivirales no integrativos (tabla 10) el único cambio respecto al protocolo descrito para los vectores lentivirales integrativos de 3ª generación fue la utilización del plásmido pMD.Lg/pRRE.D64Vint [7] como plásmido empaquetador, en sustitución del

plásmido pMD.Lg/RRE. Este plásmido es un plásmido ayudante o “helper” necesario para la producción de vectores virales de tercera generación cuya principal característica es que es deficiente en integrasa, ya que fue generado a partir del plásmido pCMVΔR9-D64V reemplazando el fragmento *BclI-AflII* [227].

Tipo de plásmido		Nombre	Particularidades
Plásmido de transferencia		pCCL.sin.cPPT.AAVS1.PGK. <i>GFP</i> .pA.Wpre [279] (VLDI:RH-<i>GFP</i>)	VL de RH que expresa eGFP.
		pCCL.sin.cPPT.AAVS1.loxP.SA.GFP.pA.loxP.PGK. <i>FANCA</i> .pA.Wpre (VLDI:RH-<i>FANCA</i>)	VL de RH que expresa eGFP y FANCA.
		pLM.CMV. <i>Cherry</i> .2A.Cre [504]	VL que expresa la proteína roja (Cherry) y CreRecombinasa.
Plásmidos empaquetadores	3ª Generación	pMD.Lg/pRRE.D64Vint [279]	Contiene los genes <i>gag</i> y <i>pol</i> y una delección que impide la expresión de la integrasa.
		pRSV-REV [508]	Contiene el gen <i>rev</i> .
Plásmido de la envuelta		pMD2-VSV-G [508]	Expresa la glicoproteína G del VSV (VSVG).

Tabla 10. Plásmidos utilizados para la generación de vectores lentivirales deficientes en integración.

3.1.3. Titulación de vectores lentivirales.

Para la titulación de los SNs lentivirales se llevaron a cabo diferentes estrategias en función de si se trataba de vectores integrativos, no integrativos, con gen marcador fluorescente o sin él.

■ Titulación de vectores lentivirales integrativos.

Para conocer el título (número de virus/ml) de los vectores lentivirales competentes en integración producidos, $3,5 \times 10^4$ células HT1080 se sembraron en una placa de 24 pocillos (p-24, Nunc) en 1 ml de medio DMEM Glutamax suplementado con 10% de FBS, 0,5 % de antibiótico (penicilina-estreptomicina) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se levantaron las células de uno de los pocillos con tripsina-EDTA (Gibco) y se contaron utilizando una cámara de conteo de Neubauer y el colorante para microscopía azul tripán (Merk).

En el resto de los pocillos se retiró el medio de las células y se añadieron 200 µl de seis diluciones seriadas de sobrenadantes (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}). A las 24 horas de incubación a 37°C se retiró el sobrenadante lentiviral y se añadieron 500 µl de medio fresco DMEM suplementado. Tras la transducción se realizaron los siguientes análisis del número de partículas en función de la existencia de un gen marcador fluorescente en el vector a titular o no:

- 1) Análisis mediante citometría de flujo:** En los vectores que poseen un gen marcador eGFP, se recogieron las células a las 48 horas tras la transfección y se analizaron por citometría de flujo. Para ello las células se trataron con tripsina-EDTA y se lavaron con PBS 1X, se centrifugaron durante 10 minutos a 600g y se les añadió una mezcla de PBA (PBS 1X + 0,5% de albúmina sérica bovina -BSA- + 0,1% azida sódica) y ioduro de propidio (0,2 µg/ml), que nos permitió excluir las células no viables. Las células se analizaron con un citómetro (EPICS ELITE-ESP cytometer,

Coulter) que nos permitió cuantificar el número de células que expresan eGFP. El título se calculó con la siguiente fórmula:

En donde:

- **T** es el título del sobrenadante lentiviral.
- **Nº de células**: Número de células que se contaron en el momento de la transducción.

$$T \text{ (UT/mL)} = [\text{Nº células} \times \% \text{ células eGFP}^+ / 100] \times \text{FD} \times \text{FC}$$

- **% células eGFP⁺**: Porcentaje de células que expresan el transgén medido por citometría de flujo.
- **FD**: Factor de dilución del sobrenadante.
- **FC**: Factor de corrección para dar el título en unidades de transfección (UT)/ml cuando el volumen final en el cuál se lleva a cabo la transducción no es de 1 ml.

2) Análisis mediante qPCR: En los vectores que no incluyen un gen marcador fluorescente se recogieron las células al cabo de 9 días. El pellet de células fue procesado con el kit DNeasy Tissue (Qiagen GmbH) para extraer el ADN genómico. Para la determinación del título se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) utilizando oligos que hibridan en las LTRs (del inglés *long terminal repeat*) presentes en todos los vectores lentivirales (LTR-F: TGTGTGCCCGTCTGTTGTGT y LTR-R: GAGTCCTGCGTCGAGAGAGC)[509]. La cuantificación del número de copias se realizó normalizando estos valores con los obtenidos tras la amplificación con los oligos de la Albúmina humana (hAlb F: 5'-GCTGTCATCTCTGTGGGCTGT-3' and hAlb R: 5'-ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC3') y extrapolando este resultado a una recta patrón realizada con diferentes diluciones crecientes del plásmido control pRRL.cppt.PGK.GFP.WPRE.Alb (desde 10⁷ a 10¹ moléculas)[510]. Este plásmido posee tanto la secuencia de las LTRs como el gen de la albúmina que es utilizado como control para el cálculo del número de células en cada muestra, lo que permite realizar una recta patrón en la que se pueden relacionar el número de copias de nuestro transgén respecto al número de copias de la albúmina. Para la reacción de qPCR se utilizó SYBR-GREEN Master Mix 2X (Applied Biosystems) que es un fluoróforo específico de ADN bicatenario y se llevó a cabo en la máquina "Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems) y se analizó con el software ABIPrism 7000 (Applied Biosystems).

■ Titulación de vectores no integrativos.

Al igual que en el caso de los vectores integrativos, los vectores deficientes en integración (VLDI ó IDLV, del inglés *integrative defective lentiviral vector*) pueden titularse por citometría de flujo o por qPCR, dependiendo de si poseen un gen marcador o no. La única diferencia radica en que las células HT1080 transducidas con los vectores deben ser recogidas a tiempos anteriores a los descritos para virus integrativos. El problema de este método es que parece estar subestimando el número real de partículas virales. Otra alternativa fue realizar una qPCR utilizando los cebadores para las LTRs descritos por Bushman y col. [509] y mencionados en el punto anterior. En este caso, el ADN se obtuvo de las células 24 horas tras la transducción, tiempo suficientemente corto para evitar la pérdida de virus debido a la división celular, pero suficiente para que se haya realizado la transcripción reversa. Sin embargo, la exactitud de este método depende de los controles utilizados y

del refinamiento de los puntos que componen nuestra curva patrón. Por ello, el método más comúnmente utilizado es la realización de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para detectar la proteína p24 presente en la cápside del VIH (Virus de la inmunodeficiencia humana). Para la realización de este ensayo se utilizó el kit comercial VIH-1 p24 ELISA (Perkin Elmer) y se siguieron las instrucciones descritas por el fabricante. Este método tampoco es del todo exacto ya que se pueden sobreestimar partículas virales que no han empaquetado el vector. Por todo ello, para obtener un título viral lo más fiable posible se combinaron los tres tipos de análisis: citometría de flujo, qPCR e inmunoabsorción.

3.2. Vectores Adenovirales.

La expresión de los ZFNs ha sido mediada por vectores adenovirales Ad5/35. La producción de estos sobrenadantes no se ha realizado en el laboratorio ya que fueron amablemente proporcionados por el laboratorio del Dr. L. Naldini (Hospital San Raffaele, Milán) y la compañía Sangamo BioSciences.

4. HORQUILLAS PEQUEÑAS DE ARN: shARNs.

4.1. Diseño de horquillas pequeñas de ARN (shARNs).

En un principio se diseñaron dos shARNs dirigidos contra la región 3' UTR del gen *FANCA* y tres shARNs (secuencias publicadas en el DEA, 2009) cuya efectividad fue estudiada y descrita en el trabajo de investigación para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados, 2009. Puesto que su eficiencia fue muy baja, en el presente trabajo no se mostrarán resultados realizados con ellos. Posteriormente, se utilizaron otros tres shARNs cuya eficacia inhibitoria había sido probada en otros tipos celulares [136], pero cuando su expresión estaba dirigida por el promotor U6. En nuestro caso, la expresión de los shARNs se encontrarán bajo el control del promotor H1, que al igual que U6 son promotores de la ARN polimerasa III. Se ha estudiado que ambos promotores tienen una eficacia similar [511], con la diferencia de que el promotor H1 favorece el funcionamiento del shARN cuando se introduce una base G en posición +1. Así pues, los shARNs utilizados tendrán las siguientes secuencias:

1. sh6FANCA ARN: Su secuencia de reconocimiento en el gen diana comienza a partir del nucleótido 5687.

Mlu I

5' **CGCGT**GCAGAGTTCTTTGTTGCTTGAA**CTCGAG**TTCAAGCAACAAAGAACTCTGTTTTGGAAAT 3'
3' **ACGTCTCAAGAAACAACGA**ACTT**GAGCTC**AAGTTCGTTGTTTCTTGAGACAAAAACCTT**AGC** 5'

Cla I

2. sh7FANCA ARN: Tiene la misma secuencia que el sh6FANCA con la única modificación de no poseer una base G en posición +1. Su secuencia en el gen diana comienza a partir del nucleótido 5687.

Mlu I

5' **CGCGT**CAGAGTTCTTTGTTGCTTGAA**CTCGAG**TTCAAGCAACAAAGAACTCTGTTTTGGAAAT 3'
3' **AGTCTCAAGAAACAACGA**ACTT**GAGCTC**AAGTTCGTTGTTTCTTGAGACAAAAACCTT**AGC** 5'

Cla I

3. sh8FANCA ARN:

Mlu I

5' **CGCGT**GCACTGCACTTTGCGATTCAA**CTCGAG**TTGAATCGCAAAGTGCACTGC TTTTGGAA**AT** 3'
 3' **ACGTGACGTGAAACGCTAAGTTGAGCTC**AACTTAGCGTTTCACGTCACGAAAAACCT**TTAGC** 5'

Cla I

4. shcontrol ARN: Además, como control negativo se ha diseñado un *shcontrol*, que es un shARN cuya secuencia no tiene ninguna diana en el genoma humano, por lo que no inhibiría ningún gen (previamente descrito por Ambion, vector pSilencer 3.1-H1 puro) y cuya secuencia es:

Mlu I

5' **CGCGT**CCCCACTACCGTTGTATAGGTG**TTCAAGAGA**CACCTATAACAACGGTAGTTTTTGGAA**AT** 3'
 3' **AGGGGTGATGGCAACATATCCACAAGTTCTCT**GTGGATATTGTTGCCATCAAAAACCT**TTAGC** 5'

Cla I

En azul se han indicado los nucleótidos correspondientes a los sitios de corte de las enzimas para realizar su posterior clonaje en el vector LVTHM y en rojo los nucleótidos correspondientes a la región de la horquilla.

4.2. Clonaje de los shARNs en el vector lentiviral LVTHM.

Para clonar las diferentes secuencias de los shARNs (6, 7, 8, o *control*) en el vector LVTHM se generó, en primer lugar, una secuencia de ADN de doble cadena con las características adecuadas para su introducción en el vector utilizando oligos complementarios a las secuencias de shARN con extremos Mlu I y Cla I.

Para ello los oligos se hibridaron a 95°C durante 4 minutos y posteriormente 10 minutos a 70°C (en un tampón acetato potásico a 100mM, HEPES -ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico- pH 7,4 y 30mM, y acetato de magnesio a 2mM). Los extremos de los oligos se fosforilaron utilizando la enzima T4 PNK (polinucleótido quinasa, M0201, New England) y el tampón de la enzima T4 ADN ligasa (M0202, New England). La reacción se incubó durante 30 minutos a 37°C y luego a 70°C durante 10 minutos para inactivar la PNK.

El plásmido LVTHM se digirió con las enzimas *MluI* (R0198, New England Biolabs) y *ClaI* (R0197, New England Biolabs), se defosforilaron los extremos cohesivos generados utilizando la enzima CIP (*calf intestinal phosphatase alkaline*) (M0290, New England) y se realizó la ligación del vector con los diferentes shARNs utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Biolabs) y su tampón (Fig. 22).

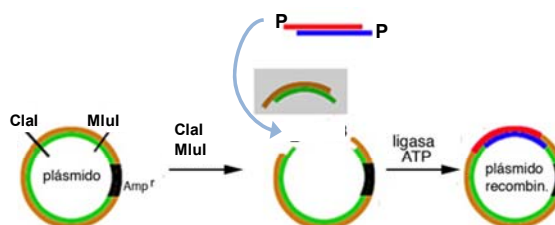


Figura 22. Esquema de la técnica de clonaje de un shARN en un vector. En azul y rojo se muestran los oligos hibridados con extremos cohesivos. Mientras que en marrón y verde se representa el vector LVTHM.

A continuación, se transformó la ligación en bacterias competentes Top 10 (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen) que se crecieron durante toda la noche a 37°C en medio agar-LB (*luria broth*, Pronadisa) con ampicilina (50 µg/ml). Se comprobaron las minipreps por

consistió, de forma básica, en la introducción de mutaciones en el plásmido a través de oligos que las contienen en su secuencia mediante una reacción de PCR. A continuación, se digirió durante 1 hora y a 37°C el plásmido parental con la enzima *DpnI*, que reconoce sitios metilados en el ADN, por lo que se destruyó la hebra parental y se mantuvo la hebra no metilada, que es la que contiene las mutaciones. Por último, se procedió a la transformación de las células de la construcción mutada en células ultracompetentes XL10-Gold (Stratagene) que son deficientes en endonucleasa *-endA1-* y recombinasa *-recA-*, lo cual ayuda a mejorar la calidad de la miniprep y asegura la estabilidad del inserto.

La confirmación de la introducción de la mutación se realizó mediante secuenciación de la región donde se introduce la mutación.

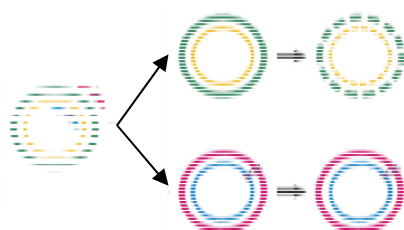


Figura 23. Esquema del método de introducción de mutaciones dirigidas en un plásmido utilizando el kit QuikChange II XL. El plásmido en color verde y amarillo es el parental metilado que tras la síntesis de la hebra mutante es digerido, mientras que el de colores rosa y azul corresponde al plásmido con las mutaciones silentes introducidas por los oligos. Las X indican la introducción de mutaciones.

6. TRANSDUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES Y CÉLULAS PRIMARIAS.

6.1. Transducción con vectores lentivirales que expresan shARNs frente al gen *FANCA*.

Las transducciones se realizaron con sobrenadantes concentrados en dos tipos celulares adherentes: MRC5 y fibroblastos primarios humanos, y en dos tipos celulares en suspensión: LCLs (línea linfoblastoide humana), derivada de un donante sano y células CD34⁺ purificadas de sangre periférica de cordón umbilical.

6.1.1. Transducción de células adherentes.

Se sembraron en una placa de 6 pocillos (p6, Nunc) 2x10⁵ células MRC5 ó 1x10⁵ fibroblastos primarios, con 2 ml de medio DMEM suplementado. A las 24 horas se cambió el medio y se añadió la cantidad correspondiente de sobrenadante (SN) concentrado para alcanzar una MOI (del inglés *Multiplicity of Infection*)= 5 (5 virus/célula). Se realizaron tres ciclos de transducción con un intervalo de 24 horas entre cada uno de ellos y cambiando a las 12 horas el medio infectivo por 2 ml de medio fresco (DMEM suplementado). 48 horas después de la última transducción se analizó el porcentaje de células eGFP⁺ por citometría de flujo.

6.1.2. Transducción de células en suspensión.

1. Transducción de LCLs: Para evaluar la eficacia de corrección de los vectores terapéuticos (PGK.*FANCA*.Wpre*, PGK.*FANCA*sh7ARN2mut.Wpre*, PGK.*FANCA*sh7ARN3mut.Wpre*) se transdujo una línea linfoblastoide (LCL) de un paciente de AF-A (AF-A 88) con estos vectores. Se preparó una placa de 6 pocillos con retronectina® (Takara, Shuzo) a una concentración de 20µg/cm² durante 24 horas a 4°C, ya que esta molécula favorece la transducción, al aumentar la

colocalización de los virus y las células diana [512-515]. Al día siguiente, se añadieron a la placa 5×10^5 células / pocillo y el volumen de SN necesario para alcanzar una MOI=5 virus/célula. Se realizaron tres ciclos de transducción cada 24 horas con centrifugaciones de 2 horas a 1455 g.

2. **Transducción de células hematopoyéticas CD34⁺**: Las células se preestimularon durante 48 horas con su medio y condiciones adecuadas (Tabla 8). Tras dos días, las células se centrifugaron y se resuspendieron a una densidad de 5×10^5 células/ml en medio fresco. Posteriormente, se añadieron los sobrenadantes a una MOI=50 y se centrifugaron las células junto con los virus durante 30 minutos a 1455g. El proceso de transducción se llevó a cabo en una placa de 6 pocillos tratada previamente con retronectina® (Takara, Shuzo) a una concentración de $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas a 4°C. Tras 12 horas de transducción, se reemplazó el medio con SN por medio fresco y al cabo de 8 horas se realizó un segundo ciclo de transducción igual al anteriormente descrito. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS 1X (Sigma) para retirar el exceso de virus y se resuspendieron en su medio a la concentración celular adecuada para su crecimiento (5×10^5 células/ml) en una placa sin tratar con retronectina.

6.2. Transducciones dirigida a la generación de iPSCs derivadas de fibroblastos AF-A corregidos por RH.

Se transdujeron diferentes tipos celulares con los siguientes propósitos:

1. **Recombinación homóloga en el sitio AAVS1 en LCLs derivadas de pacientes.** Se siembran 1×10^5 LCLs por pocillo de placa p96 (Nunc). A las dos horas, se transdujeron las LCLs añadiendo una mezcla formada por los Ad5/35 que expresa la pareja de los ZFN específicos para el sitio AAVS1 (MOI=1000) y por el vector donador deficiente en integración (VLDI:RH-*eGFP* o VLDI:RH-*FANCA*; MOI=150 ng-p24/ μl). Como controles se utilizan células sin transducir y células transducidas sólo con el vector donador deficiente en integración. El medio de transducción (RPMI, 10 % FBS, 1% de solución penicilina/estreptomicina) se suplementó con polibreno ($8 \mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich). Tras 24 horas de transducción las células se lavaron con PBS 1X, se resuspendieron en medio fresco y se analizaron a diferentes tiempos por citometría de flujo.
2. **Recombinación homóloga en el sitio AAVS1 en fibroblastos derivados de pacientes.** Se sembraron 10^5 células por pocillo de p6 (Nunc) en 1 ml de su medio de cultivo (Tabla 8) y se añadió la cantidad adecuada de los sobrenadantes de Ad5/35 ZFN (MOI=200) y del donador VLDI:RH-*FANCA* (MOI=150 ng-p24/ μl). Tras 24 horas de transducción se retiró el medio con los virus y se sustituyó por uno fresco. Al igual que en el caso anterior, se cotransdujo un pocillo con ZFN+donador, un pocillo únicamente con el vector donador y otro con células sin transducir. Los experimentos de RH se llevaron a cabo en fibroblastos que tenían entre 2-6 pases.
3. **Inmortalización de fibroblastos con VL:pLox.TERT.ires.TK.** La transducción se llevó a cabo de igual modo al explicado en el punto anterior, con un único ciclo de transducción de 24 horas y MOI=1. En comparación con un pocillo control de células sin transducir, las células transformadas mostraron mayor tasa de proliferación y menor senescencia.
4. **Transducción de fibroblastos con el vector pHAGE.STEMCCA.loxP para la generación de iPSC.** Los fibroblastos de AF previamente corregidos por RH fueron cultivados en DMEM GlutaMAX™ suplementado con 10% FBS y 0,5% de solución de penicilina/estreptomicina a 37°C, 5% CO₂, 5%

O2. Para reprogramar estas células y generar células indiferenciadas pluripotentes se sembraron 1×10^5 células por pocillo de p6 y se transdujeron con un vector lentiviral escindible pHAGE.STEMCCA.LoxP [516] que expresaba constitutivamente los cuatro factores de reprogramación (*Oct4*, *Klf4*, *Sox2* y *cMyc*) a MOI= 1. Se realizó una única ronda de transducción durante 12 horas con la cantidad adecuada de sobrenadante resuspendido en 1 ml de medio fresco. Al día siguiente este medio fue sustituido por medio fresco y a los dos días se añadió 10ng/ml del factor de crecimiento de fibroblastos humano (hbFGF, Preprotech). Cuatro días después de la transducción el medio DMEM suplementado fue reemplazado por medio de CMEs (Tabla 8). Dos días después, los fibroblastos se levantaron de los pocillos utilizando 0,5% Tripsina-EDTA 1X (Gibco) y se sembraron a una concentración de 2×10^4 fibroblastos/placa de 10 cm² (Costar) sobre una capa de 1×10^6 HFFs previamente irradiados con 45 Gy y que actúan proporcionando factores necesarios para el desarrollo y crecimiento de las iPSC. Después de 11 días aparecieron las primeras colonias de iPSCs y éstas se picaron individualmente y se crecieron en placas independientes para obtener diferentes clones.

5. Transducción de células iPSCs con el vector pLM.CMV.Cherry.2A.Cre para favorecer la escisión.

Para llevar a cabo este proceso las iPSCs se mantuvieron en Matrigel (BD) en medio condicionado (medio de CMEs que ha estado durante 24 horas en contacto con células HFF-1). Se hizo una suspensión con las iPSCs y se transdujeron con el vector pLM.CMV.Cherry.2A.Cre durante 6 horas y a 37°C. Después de 24 horas la población de iPSC se sembró en un estroma de HFF-1, con medio condicionado y a una densidad de 20.000 células/placa de 10 cm y se esperó a que formarán colonias para realizar los análisis pertinentes que confirmaran la escisión.

7. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN.

El estudio de proliferación de las células transducidas con los vectores que contienen los shARNs se realizó mediante el conteo de las células a diferentes intervalos (una vez cada 3 días para las MRC5 y fibroblastos y una vez cada 7 días en el caso de las CD34⁺). En el caso de las células adherentes, en primer lugar deben tripsinizarse y se resuspenden en 1 ml final de volumen del medio correspondiente (Tabla 8). Posteriormente, se realizó una dilución de una muestra de las células en azul de tripán y se contaron en la cámara de Neubauer. El cálculo de las células por ml se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{Nº células/ml} = \text{Nº células contadas} \times \text{dilución realizada} \times 10^4$$

10⁴: Factor utilizado para calcular el número de células contadas en un volumen de 0,1mm³ (0,1μL) y convertir el valor en número de células por mL (1000mm³ = 1000μL)

8. EXPANSIÓN DE CÉLULAS CD34⁺ INTERFERIDAS EN EL GEN *FANCA* EN PRESENCIA DE MMC O TNFα.

8.1. Sensibilidad a Mitomicina C (MMC).

Para la realización de la curva de sensibilidad a MMC, se sembraron en una placa de 24 pocillos (p24, Nunc) 5×10^4 células LCLs transducidas con los correspondientes vectores, en 1 ml de su medio de cultivo con diferentes dosis de MMC. Las concentraciones de MMC (Sigma) utilizadas

fueron: 0, 3, 10, 33, 100, 333 y 1000 nM. Las células se recogieron 5 días tras la exposición al agente químico y se analizó la viabilidad de la población eGFP⁺ mediante citometría de flujo por exclusión de células positivas a ioduro de propidio (IP).

8.2. Sensibilidad al Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α).

La sensibilidad a TNF α fue estudiada en células CD34⁺ interferidas con el VL:sh7FANCA y comparada con las células CD34⁺ transducidas con el VL:shcontrol. Para ello se sembraron 3×10^5 células CD34⁺ en pocillos de p6 con su medio de crecimiento y se trataron con 10ng/ml de TNF α . En paralelo se creció el mismo número de células sin tratar y se estudió el efecto de esta citoquina sobre la expansión celular al cabo de 7, 14 y 21 días tras el tratamiento.

9. GENERACIÓN DE UNIDADES FORMADORA DE COLONIAS (UFCs).

9.1. Estudio de UFCs en células interferidas en el gen FANCA.

Para la realización de ensayos clonogénicos se resuspendieron la cantidad adecuada de células hematopoyéticas, transducidas con los diferentes vectores, en 3 ml de medio de metilcelulosa enriquecido con citoquinas y EPO para células humanas (MethoCult™ H4434 Classic, Stemcell Technologies). Dependiendo de la fuente celular de partida se sembraron diferentes números de células:

- ✚ Para la generación de UFCs basales o primarias, después de la transducción, se sembraron entre 1.500-5.000 células/ml CD34⁺ purificadas y se mantuvieron en cultivo *in vitro* durante un tiempo máximo de una semana. A partir de este periodo, el número de células utilizado se multiplicó por diez por cada semana que transcurra.
- ✚ Para los experimentos de replaqueo, en los que la fuente celular son los progenitores hematopoyéticos obtenidos a partir de las UFCs basales, recogidas del medio de metilcelulosa y lavadas con PBS, se sembraron 250.000 células/ml.
- ✚ En el caso de células procedentes de MO de ratones injertados previamente con células CD34⁺ transducidas, se partió de un número de 100.000 células/ml.

Se alicuoteó 1 ml de mezcla de células y metilcelulosa por placa M35 (Corning) y de cada condición se realizaron triplicados. Hay que mencionar que se estudió el efecto de dos compuestos diferentes sobre la generación de UFCs:

- Efecto de la MMC a 0, 10 y 30 nM.
- Efecto de la citoquina TNF α a 0, 1 y 10 ng/ml.

Después de 14 días en cultivo a 37°C, 25% O₂ y 95% de humedad relativa (HR), se hizo el recuento de Colonias utilizando un microscopio invertido (Olympus IX70 WH10x/22, objetivo 4x). Se identificaron UCF-GMs (unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos) y BFU-Es (unidades formadoras de colonias de eritrocitos).

9.2. UFCs para el estudio de la corrección de iPSCs AF-A editadas genéticamente.

Para la realización de estos ensayos se añadieron 2×10^4 células procedentes de los cuerpos embrionarios (EB, del inglés *embryo bodies*) por cada ml de metilcelulosa H4535 (Stem Cell Technologies) suplementada con 8U/ml hEPO (Eprex). Estos EBs se generaron a partir de las iPSCs y

se individualizaron gracias a la acción de la acetasa STEMPro (Gibco). Esta mezcla se añadió a placas de 35 mm de diámetro (Costar) y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 14 días. Al cabo de este tiempo se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFCs), diferenciando entre BFU-Es (unidades formadoras de colonias eritropoyéticas) y UFC-GM (unidades formadoras de colonias granulomacrofágicas) basándonos en sus características morfológicas. Además, la caracterización del linaje del que procedían estas células se verificó mediante análisis por citometría según se indica en el siguiente apartado. Como control se estudió la capacidad proliferativa de células mononucleadas procedentes de sangre de cordón umbilical de un donante humano sano. Además, se analizó su sensibilidad a MMC tal y como se describe en el apartado 9.1 de esta sección.

10. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO Y SEPARACIÓN CELULAR.

Se realizaron diferentes análisis por citometría de flujo, en función de los objetivos planteados en cada caso:

1. **Análisis de células interferidas en el gen *FANCA*:** Coincidiendo con los días en que se realizaron contajes de células para estudiar la proliferación, se recogieron células para analizar por citometría de flujo. Se lavaron las células en 3ml de PBS 1X. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 300 µl de la mezcla de PBA (solución salina isotónica –PBS- 1X + 0,5% albúmina de suero bovino –BSA- + 0,01% de azida sódica) y yoduro de propidio [517] a una concentración de 2µg/ml. Con el IP excluiríamos las células muertas. Por último, las células se analizaron en un citómetro EPICS LITE-ESP (Beckman Coulter) y se procesaron con el programa CXP Analysis (Beckman Coulter). Se estudió el porcentaje de células que eran eGFP positivas (eGFP⁺) como indicador del porcentaje de células que expresaban el shARN. Además también analizamos el parámetro IMF (Intensidad media de Fluorescencia) para cuantificar el nivel de expresión de *eGFP*. Para seleccionar aquellas células con expresión de eGFP, se ha recurrido a la separación de las células mediante un separador celular para conseguir una población transducida con alto porcentaje de expresión. Las células fueron procesadas con un separador celular Beckman Coulter EPICS ALTRA Cell Sorter que seleccionó las células verdes, eGFP⁺, con alta IMF y por tanto, que contienen el vector que expresa nuestro shARN.
2. **Análisis de células eGFP⁺ tras inducir la RH.** Las células transducidas con los ZFNs y el vector donador se crecieron al menos 14 días tras su transducción y se analizaron 1–5×10⁵ células viables por citometría de flujo (FACSCalibur; Becton Dickinson Pharmingen). Posteriormente, la población eGFP⁺ fue enriquecida mediante selección en un separador celular (BD Influx™ cell sorter).
3. **Análisis de la eficiencia de transducción con el vector de escisión en iPSCs.** Se analizó la expresión de la proteína Cherry, mediante citometría de flujo, en las iPSCs transducidas con el vector no integrativo pLM.CMV.Cherry.2A.Cre un día después de la transducción.
4. **Análisis inmunofenotípico de células diferenciadas hacia Células Madre/Progenitoras Hematopoyéticas.** Estos análisis se llevaron a cabo en los días 14 y 21 tras el inicio del proceso de diferenciación. Los cuerpos embrionarios formados durante la diferenciación se

resuspendieron en StemPro acutasa durante 10 minutos a 37°C y en agitación para favorecer la disgregación en células individualizadas. Tras su centrifugación a 200 g durante 5 min, se marcaron con los siguientes anticuerpos siguiendo las instrucciones del fabricante: anti-CD34 humano conjugado con ficoeritrina (PE)-Cy7 (BD Pharmigen), anti-CD31 humano conjugado con ficoeritrina (PE) (eBiosciences), anti-CD45 humano conjugado con alofocianina (APC) (BD) y anti-CD43 humano conjugado con isotiocianato fluoresceína (FITC) (BD). Como controles se usaron isotipos combinados con fluorocromos. La utilización de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Roche) nos permitió excluir las células no viables del análisis (DAPI positivas).

En los puntos del 2-4 los análisis se realizaron utilizando el software FlowJo vX.

5. **Estudio del ciclo celular. Parada en G2/M:** El ciclo celular se evaluó en las mismas líneas celulares que el análisis de la apoptosis y en las mismas condiciones experimentales. En este caso, se midió la cantidad total de ADN en cada célula mediante citometría de flujo. Después del cultivo de las células en ausencia o presencia de MMC 33 nM durante 3 días, se recogieron 1×10^6 células y se fijaron con etanol al 70% frío (-20°C) durante 2 horas a -20°C. A continuación se lavaron las células para eliminar el etanol de las muestras y se resuspendieron en 1 ml de una solución de PBS con IP 5 µg/ml (Molecular Probes) y con ARNasa A 0,1 mg/ml (Sigma) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se analizaron 1×10^4 células por citometría de flujo (Coulter XL) con fluorescencia lineal del IP (contenido de ADN) y discriminación de los dobletes. La cuantificación de la fluorescencia del IP de las células fijadas mediante el programa ModFit LT™ (Verita Software House, Topshan, ME) permitió clasificar las células según el contenido de ADN: 2n (fase G₀₋₁), 4n (fase G₂) o intermedio (fase S).
6. **Estudio del daño genotóxico. Análisis por citometría de flujo de γH2AX:** Para evaluar el efecto genotóxico generado por MMC mediante la detección de DSB, se evaluó por citometría de flujo la fosforilación de la histona γH2AX [518] en las células CD34⁺ sin y con interferencia para *FANCA*. Para ello, $1-5 \times 10^6$ células tanto tratadas como sin tratar con MMC (33nM) se centrifugaron a 300g durante 4 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS. Se fijaron con 1% de formaldehído libre de metanol (Polysciences) en PBS frío. Tras 15 minutos en hielo, se lavaron las células con PBS y se sometieron a un segundo paso de fijación con etanol al 70% y a -20°C durante al menos dos horas. A continuación se realizó otro lavado con PBS y se resuspendieron en una solución de 2 mL de BSA-T-PBS (1% de albúmina sérica bovina, BSA –Sigma- y 0,2% de Tritón X-100 –Sigma- en PBS) durante 5 minutos. Tras centrifugar las células a 300g durante 4 minutos, se incubaron durante toda la noche en 100 µl de la solución BSA-T-PBS conteniendo 1 µg del anticuerpo primario γH2AX (Upstate, JBW301). Al día siguiente y tras lavar el Ac primario, se resuspendieron en 100 µl de BSA-T-PBS conteniendo la cantidad adecuada del anticuerpo secundario FITC (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Invitrogen), y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron durante 2 min a 300 g y se resuspendieron las células en 1ml de solución con IP (2µg/ml). Finalmente, las células fueron analizadas utilizando un citómetro EPICS LITE-ESP (Beckman Coulter) y

procesadas con el programa CXP Analysis (Beckman Coulter). Utilizando distribuciones bivariantes fue posible distinguir subpoblaciones de células en G₁, S y G₂/M basadas en diferencias en el contenido de ADN.

7. **Análisis inmunofenotípico de células CD34⁺ interferidas trasplantadas en ratones inmunodeficientes.** A partir de MO obtenida por punción medular de ratones inmunodeficientes trasplantados se lisaron las células con el objetivo de eliminar la población eritroide y se marcaron con anti-CD45 humano conjugado con TRI-COLOR[®] (TC, PE-Cy5), un marcador de células hematopoyéticas humanas, combinado con anti-CD34 humano conjugado con ficoeritrina (PE) (BD) (marcador de células progenitoras hematopoyéticas humanas). Estos análisis se realizaron utilizando un citómetro EPICS LITE-ESP (Beckman Coulter) y procesadas con el programa CXP Analysis (Beckman Coulter).

11. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR qPCR.

11.1. Análisis de ARNm de *FANCA*.

La expresión del gen humano *FANCA* (h*FANCA*) se analizó mediante PCR transcriptasa reversa cuantitativa a tiempo real (del inglés, *real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, qRT-PCR) con el objetivo de evaluar el grado de inhibición del gen h*FANCA* mediado por los diferentes shARNs utilizados y evaluar la expresión del gen humano *FANCA* (h*FANCA*) en los diferentes clones de iPSC corregidos por edición génica. Para ello se extrajo el ARNm de 1x10⁶ células utilizando el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen GMBH) o bien utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen).

En ambos casos, el ARNm obtenido fue transcrito de forma reversa utilizando el kit RETROscript (Invitrogen) para obtener ADN complementario (ADNc). Éste se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) utilizando TaqMan Universal Mastermix 2x, NoAmpErase UNG (Applied Biosystems Roche) y se llevó a cabo en el Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research). La expresión relativa del transgén *FANCA* fue determinada mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [519], utilizando oligos que hibridan en el ADNc de h*FANCA* (FANCA-F: 5'-GCTCAAGGGTCAGGGCAAC-3' y FANCA-R, 5'-TGTGAGAAGCTCTTTTCGGG-3') y fueron detectados utilizando la sonda h*FANCA*-P (5'-FAM-CGTCTTTTCTGCTGCAGTTAATACCTCGGT-BHQ1-3') [520]. Como gen constitutivo para realizar la relativización se utilizó el gen de la β -actina humana β -actina-F: 5'-ATTGGCAATGAGCGGTTCC-3', β -actina-R: 5'-CACAGGACTCCATGCCCA-3' y la sonda β -actina-P: 5'-TexasRed-CCCTGAGGCACTCTTCAGCCTTCBHQ2-3'.

11.2. Expresión de genes de pluripotencia en clones de iPSCs.

Se estudió la expresión por qRT-PCR de los genes de pluripotencia, tanto la expresión de los genes que se han introducido ectópicamente (transgenes de reprogramación del vector lentiviral), como la expresión de los factores endógenos de transcripción asociados a pluripotencia.

En primer lugar, se extrajo el ARN total utilizando el kit "High pure RNA isolation" (Roche) y los ADN codificantes se obtuvieron mediante transcripción reversa utilizando el kit RETROscript de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR a tiempo real se llevó a cabo utilizando SYBR green (Roche) en la máquina "Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems)

y los resultados se analizaron con el programa ABIPrism 7000 (Applied Biosystems). Las parejas de cebadores utilizadas se describen a continuación (tabla 12):

Nombre	Secuencia cebadores	Función
OCT4 endo	F: 5'TTCGCAAGCCCTCATTT3' R: 5'CCATCACCTCCACCACCT3'	Amplifica el gen endógeno Oct-4 (<i>octamer-binding transcription Factor 4</i>). Es un factor de regulación transcripcional, miembro de la familia del homeodominio PO que codifica para la proteína POU5F1. Se expresa en CMEs y células germinales y está implicado en su autorrenovación [521, 522].
mOct4 exóg	F: 5'AAGTTGGCGTGGAGACTTTG3' R: 5'TACGGTAGGGAGGCGTCTT3'	Amplifica el transgén Oct4 del vector pHAGE.STEMCCA.loxP
SOX2 endo	F: 5'TGCTGCCTCTTTAAGACTAGGAC3' R: 5'CCTGGGGCTCAAACCTCTCT3'	Amplifica el gen SOX2 (SRY-related HMG-box 2), un factor de transcripción involucrado en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación del destino celular. Es necesario para el mantenimiento de ciertas células madre [523].
mSox2 exóg	F: 5'CGCGGAGTGGAAGAAAGTA3' R: 5'AAGAGGACCCGGTAGAATGC3'	Amplifica el transgén Sox2 del vector pHAGE.STEMCCA.loxP
KLF4 endo	F: 5'GACCACCTCGCCTTACACAT3' R: 5'TTCTGGCAGTGTGGGTCATA3'	Amplifica el gen Klf4 (<i>Kruppel-like factor 4</i>), un factor de transcripción que regula la expresión de factores de transcripción claves en el desarrollo embrionario. Tiene funciones importantes en mantenimiento de las CME y en prevenir la diferenciación [524, 525].
NANOG	F: 5'TCTCCAACATCCTGAACCTCA3' R: 5'TTGCTATTCTTCGGCCAGTT3'	Amplifica el gen Nanog, que es un factor regulador de la transcripción involucrado en la proliferación y autorrenovación de la masa celular interna de las células madre pluripotentes. Favorece la pluripotencia en células CME y previene la diferenciación [526].
MYC endo	F: 5'GCTGCTTAGACGCTGGATT3' R: 5'TAACGTTGAGGGGCATCG3'	Amplifica el gen endógeno c-Myc. Es una proteína multifuncional con implicaciones en progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular [527, 528].
MYC total	F: 5'AGCGACTCTGAGGAGGAACA3' R: 5'CTCTGACCTTTTGCCAGGAG3'	Amplifica tanto el transgén Myc del vector pHAGE.STEMCCA.loxP como el gen endógeno
REX1	F: 5'AGGCTGGCAGAGAAGTCG3' R: 5'TCCTCTTGGCACCTGTGG3'	Amplifica el gen Rex-1 (Zfp-42) que codifica una proteína de dedo de Zinc, que se expresa a elevados niveles en CME [529].
GADPH	F: 5'GGCATGGACTGTGGTCATGA3' R: 5'TGCACCACTGCTTAGC3'	Gen constitutivo para normalizar los niveles de expresión.

Tabla 12. Cebadores utilizados para detectar la expresión de genes de pluripotencia.

Las muestras se analizaron por duplicado. Los niveles de expresión se normalizaron al gen constitutivo humano *GAPDH*. La expresión relativa de cada gen se comparó con líneas indiferenciadas de CMEs (la H9 y la ES4) que fueron cuantificadas utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

12. ANÁLISIS DE NÚMERO DE COPIAS POR qPCR.

Con esta técnica se pretende detectar el número de copias tanto del vector de RH, como del vector de reprogramación a lo largo del genoma. Para ello se extrajo el ADN genómico con kit de DNeasy Blood & Tissue siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizaron 100 ng de ADN para evaluar por qPCR la presencia de la integración del vector, para lo cual se detectaron los siguientes transgenes, según el caso:

- Detección del número de copias del vector VLDI:FANCA-RH:** Para evaluar el número de copias del vector de HR se detectó el gen eGFP utilizando los siguientes oligos: eGFP F: 5'-GTAAACGGCCACAAGTTCAGC-3', eGFP R: 5'-TGGTGCAGATGAAGTTCAGGG-3' y la sonda 5' [6FAM]-CTTGCCGTAGGTGGC-[BHQ1]-3' (SIGMA) (Fig. 24).

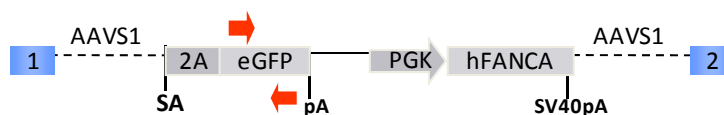


Figura 24. Esquema del vector VLDI:RH-FANCA y la hibridación de los cebadores con el ADN para la detección del número de copias mediante la amplificación del gen eGFP. Las flechas rojas indican la posición de los cebadores en el gen eGFP y los rectángulos azules corresponden a los exones 1 y 2 del gen *PPP1R2C*.

- 2. Detección del número de copias del vector de reprogramación en los clones iPSC:** En este caso, para evaluar el número de copias del vector de reprogramación (pHAGE.STEMCCA.loxP), se utilizaron cebadores que detectaban la región Wpre F: 5'GGCACTGACAATTCCGTGGT3' y R: 5'AGGGACGTAGCAGAAGGACG3' (Fig. 25).



Figura 25. Esquema del vector STEMCCA en el que se muestra la zona de hibridación de los cebadores con el ADN para la detección del número de copias del vector de reprogramación pHAGE.STEMCCA.LoxP mediante la amplificación de la secuencia Wpre. Las flechas rojas indican la posición de los cebadores en la secuencia Wpre.

La amplificación del transgén eGFP o de la región Wpre fue determinada mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como fue reportado previamente [519]. Los valores obtenidos fueron normalizados al gen *hAlbúmina* puesto que es un gen constitutivo o *housekeeping* y nos sirvió como control. Los oligos utilizados para amplificar este gen fueron *hAlb* F: 5'-GCTGTCATCTCTGTGGGCTGT-3' y *hAlb* R: 5'-ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC-3' y la sonda *hAlb*-P 5'[TexasRed] CCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCC [BHQ2]3' (SIGMA). La reacción fue realizada utilizando el reactivo TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) (Applied biosystems). Para calcular el número de copias es necesario extrapolar los valores obtenidos a una recta patrón de valores conocidos. Por ello, se generó una curva estándar con valores conocidos del plásmido pRRL.cppt.PGK.GFP.Wpre.Alb (desde 1×10^7 a 1×10^1 moléculas/ μ l) [530]. Además en todas los análisis de PCR a tiempo real para calcular número de copias se incluyó como control una muestra de ADN de células HT4 (cedida por Genethon [510]) que contiene una copia del vector lentiviral PGK.GFP.Wpre.Alb insertado por cada célula, por lo que se utilizó como control de referencia. Los genes con un valor de Ct ≥ 37 fueron excluidos del análisis. La reacción de qPCR se llevó a cabo en el sistema Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y los resultados se analizaron con el programa ABIPrism 7000 (Applied Biosystems).

13. DETECCIÓN DE LA INTEGRACIÓN DEL CASETE DE RH POR PCR.

Para detectar la integración específica del casete de RH en el sitio AAVS1 en el que cortan los ZFNs se realizó una PCR convencional en la que se utilizaron dos pares de cebadores diferentes para la amplificación de los extremos 3' y 5' de la unión del casete-gen endógeno (Fig. 26). En la región 5' se utilizó un oligonucleótido que hibrida en la región 5' del locus AAVS1, descrito previamente por Lombardo y col. [7] y otro para el gen eGFP (AAVS1 F: 5'-AACTCTGCCCTCTAACGCTGC-3' y eGFP R: 5'-TGGTGCAGATGAACTTCAGGG-3'), utilizando las siguientes condiciones de amplificación: 2 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30s a 58°C, 1 minuto a 72°C y un paso final de 5 minutos a 72°C. Para la unión en 3' se utilizaron oligonucleótidos para el gen *hFANCA* y otro para la región 3' del gen

AAVS1, previamente descrito por Lombardo y col. [7] (hFANCA F: 5'-AAAGCTCGTCTTTTCTGCTGCAGT-3' y AAVS1 R: 5'-AACGGGGATGCAGGGGAACG-3') siguiendo las condiciones de amplificación: 2 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30s a 59°C, 1 minuto a 72°C y un paso final de 5 minutos a 72°C. La integración adecuada del casete de RH generó un amplicón de 1195 pb para la unión en 5' y uno de 1314 pb para la integración en 3' que fueron resueltos en geles de agarosa al 2% y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio utilizando el analizador *Gel doc XR* (BioRad Laboratories) y el software Quantity one (BioRad)

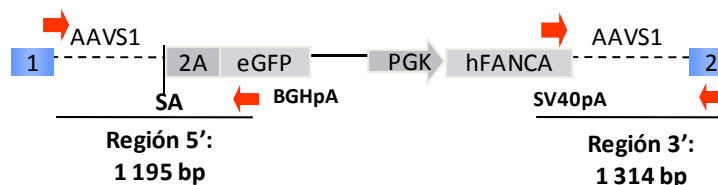


Figura 26. Esquema de la hibridación de los cebadores con el ADN para la comprobación por PCR de la integración del casete de expresión en el sitio seguro AAVS1. Las flechas rojas indican el sitio de unión de los cebadores, los cuadrados azules corresponden a los exones del gen AAVS1 y los tamaños esperados de amplicón son los señalados debajo del esquema.

14. SOUTHERN BLOT: INTEGRACIÓN DEL VECTOR VLDI:RH-FANCA EN EL GENOMA.

Finalmente para verificar la integración única del vector de RH en el genoma humano se realizó un análisis de Southern Blot (SB). La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando una solución compuesta de 50mM Tris-HCl 1M pH8 (Sigma), 100 mM EDTA pH8, 100 mM NaCl (Merk), 1% Lauril Sulfato (SDS, Sigma), H₂O y proteinasa K (Qiagen)]. Se digirieron 10 µg de ADN de cada muestra con la enzima *BstXI* (New England Biolabs) o con *BglII* (New England Biolabs). El ADN digerido se migró en un gel de agarosa al 0,8% a 40 V durante toda la noche y posteriormente se incubó el gel en una dilución 1:50 de HCl 37% durante 20 minutos para que se produjera la hidrolización de enlaces de las purinas del ADN y así facilitar su transferencia. La transferencia, también realizada durante toda la noche, se llevó a cabo en solución alcalina (NaOH 0,4M) que favorece la desnaturalización del ADN y su transferencia a una membrana de nylon (Hybond XL, GE Healthcare). Al día siguiente la membrana se lavó con un tampón salino de citrato sódico (SCC) 2X formado por 3M de cloruro sódico y 300 mM de citrato trisodio ajustado a un pH=7,0 con HCl. El siguiente paso fue fijar el ADN en la membrana mediante calor, sometiéndola a 70-80°C en una estufa durante 1-2 horas. Posteriormente la membrana se prehibridó a 42°C durante 2-4 horas con la solución de prehibridación (50% v/v de formamida, 25% v/v de 0,5M NaH₂PO₄ pH=7,2, 15% v/v de H₂O, 5ml 5M NaCl y 7% p/v de SDS). A continuación, se marcó el ADN con la sonda marcada radioactivamente con ³²P. La sonda consiste en un fragmento de ADN del gen que deseamos detectar (AAVS1 o eGFP) y se obtuvo mediante PCR (Tabla 13). Para marcar la sonda se desnaturalizó a 95°C durante 3 minutos 50 ng del ADN que actuará como sonda. Posteriormente se mezcló con el sistema de marcaje de ADN Rediprime™ II (Amersham) que consiste en una reacción que contiene una solución tamponada de dATP, dGTP, dTTP, la enzima *Klenow* y oligos al azar previamente mezclados y al cuál se le añadieron 50 µCurios del nucleótido dCTP ³²P. Esta mezcla se incubó durante 20 minutos a 37°C para que así tuviera lugar la incorporación de los nucleótidos marcados en la sonda. Tras este proceso se eliminaron el resto de nucleótidos no incorporados en la sonda mediante la purificación de esta mezcla a través de una columna de sephadex (GE Healthcare). La sonda purificada se mezcló con 400 µl de esperma de

salmón y se desnaturalizó durante 10 minutos a 95°C. Finalmente esta solución se añadió a la membrana junto con la solución de hibridación (posee la misma composición que la solución de prehibridación) y se incubó durante toda la noche a 42°C. Al día siguiente, se retiró la sonda y la membrana se lavó dos veces con SSC2X, posteriormente se realizaron tres lavados de 20 minutos a 65°C con SSC 0,2% + SDS 0,1% y un último lavado con SSC2X, previo a la exposición de la membrana. Las integraciones se detectaron utilizando el Molecular Imager Fx (BioRad) y para la cuantificación de la intensidad de las bandas se utilizó el programa Quantity One (BioRad).

Nombre Sonda	Condiciones de PCR	Función	Enzima utilizada digestión ADN genómico	Bandas obtenidas
eGFP	2 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30s a 55°C, 1 minuto a 72°C y un paso final de 5 minutos a 72°C	Permite detectar integraciones específicas en el sitio AAVS1 y al azar	Bst XI	Integración del casete en AAVS1: 5,1 Kb
AAVS1 Extremo 3'	2 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30s a 58°C, 1 minuto a 72°C y un paso final de 5 minutos a 72°C	Gracias a su hibridación con una secuencia del gen AAVS1 en el extremo 3' fuera del sitio de homología con los brazos de recombinación, permite la detección tanto del alelo del gen endógeno AAVS1 (en el caso de que la integración del casete de expresión se haya producido en heterocigosis), como de la integración específica del casete de RH en el locus diana	BglII	Alelo sin integración: 3,5 Kb Integración del casete en AAVS1: 5,3 Kb

Tabla 13. Resumen de las sondas utilizadas y la información que proporcionan.

15. SECUENCIACIÓN DE LA MUTACIÓN EN UN PACIENTE AF-A.

El paciente AF-A 52 posee dos mutaciones en el gen *hFANCA*. Por un lado la sustitución de una T por una C en el exón 8 (c.710-5T>C) y por otro la inserción de una G que modifica el marco de lectura en el exón 36 (c.3558insG). Puesto que nuestro método de corrección por terapia génica se basa en la introducción de una copia correcta del gen *FANCA* en el locus *AAVS1*, evaluamos la persistencia de las mutaciones causantes de la patología en las iPSCs generadas a partir de los fibroblastos corregidos. Esto nos permite confirmar que la corrección se debía a la introducción de la versión del gen corregido en el locus *AAVS1*, y no a la reversión de la mutación, y también nos permitió confirmar la identidad de las iPSCs.

Para ello se diseñaron cebadores en la regiones intrónicas flanqueantes a los exones de modo que se pudieran amplificar completamente las regiones correspondientes a cada exón. Además la inclusión de estas zonas intrónicas es importante para la detección de posibles mutaciones de corta-empalme o *splicing*. Los cebadores utilizados para amplificar el exón 8 y 36 del gen *hFANCA* se detallan en la siguiente tabla 14 :

Exón	Directo	Reverso	Tm	Tamaño
8	5'- CTGAAGTGGATGGTCTGTGCC - 3'	5'- CCCGTAAATAGGTACAAACAGC - 3'	58°C	278pb
36	5'- GTCATGGCTGGGGCAGCGGAG - 3'	5'- TCCCTGCTCACACGAGAGG - 3'	58°C	333pb

Tabla 14. Cebadores para la detección de las mutaciones del paciente AF-A 52 en las iPSC generadas a partir de fibroblastos AF-A 52 EG.

La amplificación de los fragmentos deseados se llevó a cabo mediante una PCR utilizando la Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y cuyas condiciones consistieron en un ciclo de desnaturalización de

5 minutos a 94°C; 30 ciclos formado por 3 etapas de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 58-60 grados y 40 segundos a 72°C, y un ciclo final de extensión a 72°C durante 5 minutos.

Los fragmentos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2% y las bandas obtenidas se purificaron con el kit de extracción de ADN NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). La secuencia del ADN correspondiente a los productos de amplificación se determinó mediante secuenciación automática con el equipo ABI 3730XL (Applied Biosystems). El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante dos métodos:

- ✦ Alineamiento local: Permite la comparación de pequeños fragmentos de ADN de dos secuencias en toda su longitud. Para ello se utilizó el programa “EMBOSS Matcher - Pairwise Sequence Alignment” (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/nucleotide.html). Los alineamientos obtenidos fueron comparados, finalmente, con la base de datos genética “ensembl” (<http://www.ensembl.org/index.html>).
- ✦ Interpretación de los cromatogramas de las secuencias: Permite un mejor análisis de las mutaciones ya que se puede determinar si se ha producido un cambio en el marco de lectura, una delección, una inserción o si existe una segunda mutación o retromutación dentro de la ya identificada. Para visualizar los cromatogramas de las secuencias se utilizó el programa “Chromas Lite 2.01”.

16. ANÁLISIS DE METILACIÓN EN PROMOTORES DE *OCT4* Y *NANOG*.

En nuestro trabajo se ha determinado el estado de metilación de las islas CpG en los promotores de dos genes implicados en pluripotencia (*NANOG* y *OCT4*).

Para ello se extrajo ADN genómico de los clones iPSC de interés, de CMEs control y de los fibroblastos derivados del paciente AF-A 52 con el kit DNeasy Blood & Tissue. Tras la cuantificación de las muestras se realizó el tratamiento con bisulfito sódico con el kit Epitect Bisulfite (Qiagen). El tratamiento con este compuesto promueve la conversión de las citosinas (C) no metiladas en Uracilos (U), mientras que las Cs metiladas no se modifican. Seguidamente se realizó una PCR específica de bisulfito (BSP, del inglés *bisulfite-specific PCR*) para amplificar la secuencia deseada. Esta reacción se llevó a cabo utilizando la enzima *Taq Platinum*, una enzima *Hot Start* que evita inespecificidades y que añade una cola de Adeninas (A) lo cual facilitará su posterior clonaje en el plásmido TOPO TA. Las condiciones estándares de la PCR “*Hot Star*” consistieron en un paso de 1 minuto a 95°C; 35 ciclos que incluyen desnaturalización de 1 min a 95°C, anillamiento a 58°C durante 1 minuto y extensión 1 minuto a 72°C, y un último ciclo a 72°C durante 10 minutos. Dependiendo del promotor a estudiar se utilizaron las siguientes parejas de cebadores:

- ✦ Para el análisis del promotor de *OCT3/4* se realizó una PCR en la que se obtuvo un producto de 466 pb de longitud con 12 islas CpG mediante la amplificación con la siguiente pareja de cebadores [9] F: 5’GAGGTTGGAGTAGAAGGATTGTTTTGGTTT3’ y R: 5’CCCCCTAACCCATCACCTCCACCACCTAA3’.
- ✦ Del mismo modo, para el análisis del promotor de *NANOG* se realizó una PCR utilizando la pareja de cebadores F: 5’TGGTTAGGTTGGTTTAAATTTTGG3’ y R: 5’

AACCCACCCTTATAAATTCTCAATTA3' [9] que produjeron un amplicón de 335 pb de longitud y que incluía 8 islas CpG.

Los productos de PCR obtenidos se migraron en un gel de agarosa al 2% y las bandas obtenidas se purificaron con el kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Life Sciences). A continuación, las bandas amplificadas se clonaron utilizando el kit TOPO-TA Cloning® *Kit for Sequencing* (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) para transformar bacterias Top10 según el procedimiento estándar (ver material y métodos, apartado 4.2). Las bacterias se sembraron en placas de agar con ampicilina o kanamicina (tienen resistencia a ambos antibióticos) y previamente tratadas con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Al día siguiente se picaron 10 colonias blancas, que eran aquellas que habían incorporado el fragmento de ADN deseado, y de ellas se extrajo el ADN con el kit Wizard® *Plus* Minipreps DNA Purification System (Promega) que fue secuenciado utilizando el primer M13 Reverse.

Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia modificada proporcionada por el programa Methprimer. Este programa se utilizó para el análisis del número de dinucleótidos CpG que existen en la secuencia. Como criterio para el análisis se definió una isla CpG como aquella región de más de 200 pb con un contenido de C/G del 60% y una presencia estimada de CpG>0,6.

17. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE FANCA Y FANCD2 MEDIANTE WESTERN BLOT.

Se llevó a cabo un análisis de Western Blot para determinar el nivel de la proteína FANCA y FANCD2 en las siguientes células:

- Células antes y después de la interferencia de *FANCA*, para lo cual se purificó el extracto de proteína nuclear de 5×10^6 células totales mediante Nuclear Extraction Kit (Chemicon Internacional) siguiendo las instrucciones detalladas por la casa comercial.
- Clones de iPSCs de los cuales se obtuvieron los lisados totales proteicos con el tampón RIPA (1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,2, 1 mM EGTA, e inhibidores de proteasas (Mini-complete; Roche).

La cuantificación de la cantidad de proteína se realizó mediante el método Bradford (BioRad), cargando 40 μ g de cada muestra. Posteriormente, se realizó la electroforesis en geles de poliácridamida en gradiente del 4 al 12% y en condiciones desnaturalizantes y reductoras con tampón MOPS (tampón de 3-morfolino-1-propanosulfonato), empleando los geles comerciales Novex® 4-12% Tris-Glycine Express Kit 1.0 mm, 15 pocillos (Invitrogen life Technologies) o geles elaborados en el laboratorio de Tris-Glicina (4% concentrador y 6% separador). Se corrieron durante aproximadamente 3 h a 130 V y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Life Science), durante 30 minutos a 15 V en un sistema de transferencia semiseco (*Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell*, BioRad) o durante 2 horas a 90 V en un sistema de transferencia húmedo (*Criterion Cell and Single-Row AnyGel Stand*, Biorad). El tampón de transferencia está compuesto por Tris/HCl 0,25 M, pH 8,3; glicina 192 mM, metanol 20 % y SDS 10%. Tras la transferencia, se realizó una tinción reversible de la membrana con rojo Ponceau (rojo Ponceau-S al 2% en acético al 1%) que nos permite detectar que la transferencia se llevó a cabo con éxito.

Una vez transferidas las proteínas, se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana utilizando una solución de bloqueo preparada con leche en polvo (5%) diluida en TBS-T (50 mmol/l Tris-HCl, pH8,0, 150 mmol/l NaCl y 0,1% Tween20) durante 1 h y en agitación a temperatura ambiente.

Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo anti-hFANCA generado en conejo (ab5063, Abcam), diluido 1:1000 en TBS con leche al 0,5%, durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con TBS-T y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo generado en cabra (pAb to Rb IgG-HRP, ab6721-1, Abcam) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave. Finalmente el exceso de anticuerpo secundario se eliminó con tres lavados con TBS-T. La detección de la señal quimioluminiscente (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, USA) se realizó mediante la exposición de películas fotográficas (Amersham) y una reveladora automática (Curix60, AGFA).

Para la detección de la proteína FANCD2, se eliminó el anticuerpo de FANCA mediante el lavado durante 20 minutos a temperatura ambiente con la solución Re-blot-mild (Chemicon) y se incubó la membrana con el anticuerpo policlonal FANCD2 (ab2187, Abcam). El resto del procedimiento se llevó a cabo igual que en el caso de la detección de FANCA.

Finalmente, para determinar la cantidad de proteína como control de carga se utilizó el anticuerpo anti- β -actina generado en ratón (ab6276, Abcam). En este caso como anticuerpo secundario se utilizó el anti-ratón generado en oveja (pAb to mouse IgG - H&L -HRP, ab 6808, Abcam).

La cuantificación de las bandas FANCA y FANCD2 y su relativización respecto a la β -actina se llevó a cabo mediante el software ImageJ.

18. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE MARCADORES CELULARES E IDENTIFICACIÓN DE TEJIDOS.

18.1. Identificación de marcadores celulares.

18.1.1. Análisis de focos nucleares de FANCD2 por Inmunofluorescencia.

Para poner de manifiesto los focos de reparación en el núcleo de la célula se realizó un marcaje de inmunofluorescencia de la proteína FANCD2.

Para ello se sembraron, por duplicado, en portas con cámara (Nunc, Sigma) tratados con 1 ml de gelatina 0,1% a 37°C durante toda la noche, 5×10^4 células adherentes (MRC5, fibroblastos primarios o células derivadas de iPSCs) ó 5×10^5 células CD34⁺/ml en portaobjetos pre-tratados con retronectina ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas a 4°C). Veinticuatro horas después, se trató durante 16 horas uno de los duplicados con Mitomicina C (MMC, SIGMA): 40nM para los experimentos de interferencia y 200 nM para los experimentos de RH, para promover la acumulación subnuclear de las horquillas de replicación de ADN bloqueadas. Al día siguiente, se lavaron las células con TBS y se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 3,7% (Sigma-Aldrich) en PBS 1X. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBS (20 ml Tris-HCl 1M, 35 ml NaCl 4M y 945 ml de H₂O) y se incubaron las muestras con Tritón X100 (SIGMA, UK) 0,5% durante 5 minutos para permeabilizar la membrana. Tras esta incubación se lavaron las células 3 veces con TBS. A

continuación, se procedió al bloqueo de los sitios inespecíficos utilizando para ello un tampón compuesto por Nonidet-P40 (Sigma) 0,1%, y 10% suero fetal bovino (FBS). Después de 45 minutos, se incubaron las células con el anticuerpo primario FANCD2 humano (ab2187-50, Abcam), diluido 1:200, en el tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Tras la realización de tres lavados de 10 minutos de las células con TBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario IgG anti conejo conjugado con el fluorocromo TexasRed (711-075-152, Jackson ImmunoResearch laboratorios), diluido 1:500 en tampón de bloqueo, y con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) 1:400 (Roche) que se une de forma específica al ADN. Tras 45 minutos de incubación a temperatura ambiente se lavaron las células 3 veces con TBS y se procedió al montaje de los portas con moviol y a su almacenamiento a 4°C.

Las preparaciones se observaron con un microscopio de fluorescencia Axioplan 2 imaging (Carl Zeiss) utilizando una distancia de trabajo 100x/1,45 con aceite de inmersión y el objetivo de 0,17 mm. Se contabilizó el número de células con más de 10 focos nucleares en un total de 200 células por preparación. Las imágenes fueron capturadas con una AxioCam MRm (Carl Zeiss) y procesadas con los programas AxioVision versión 4.6.3 (Carl Zeiss) y Corel Photo-Paint 11 (Corel).

18.1.2. Estudio de la pluripotencia en iPSCs por inmunocitoquímica y tinción con fosfatasa alcalina.

Uno de los análisis que se realizó para evaluar el estado pluripotente de las colonias de iPSCs generadas, fue estudiar la expresión de diferentes marcadores de pluripotencia. Para ello se crecieron colonias de iPSCs en pocillos de placas de p-6, se fijaron con paraformaldehído al 3,7% (Sigma-Aldrich) y se mantuvieron en PBS1X, para la posterior detección de estos marcadores.

Por un lado, se llevó a cabo la tinción con el kit *Vector Blue Substrate* (Vector Laboratories, <http://www.vectorlabs.com>) para detectar la expresión de la fosfatasa alcalina (AP), que se realizó tal y como se indica en las instrucciones del fabricante.

Por otro lado, las colonias de iPSCs se marcaron con anticuerpos inmunofluorescentes que detectan marcadores de pluripotencia: OCT3/4 -ver tabla 12-, NANOG -ver tabla 12, TRA-1-60 que es un antígeno que se expresa sobre la superficie de las CME humanas y que está asociado con un proteoglicano pericelular de la matriz, y SSEA-4 que es el antígeno-4 embrionario específico de estadio que se expresa en CME. El protocolo para realizar dicho marcaje es el mismo que el que se siguió para la detección de focos FANCD2. Tras la fijación con paraformaldehído y la permeabilización de las muestras, éstas se incubaron con anticuerpo (ac) de conejo anti-NANOG (ab21624, Abcam), ac de ratón anti-Tra-1-60 (ab16288, Abcam), ac de conejo anti-Oct4 (ab19857, Abcam) o ac de ratón anti-SSEA4 (ab16287, Abcam). Como anticuerpos secundarios se utilizaron Alexa Fluor488 generado en cabra contra IgG de conejo (A11008, Molecular Probes) y AlexaFluor594 generado en cabra para detectar IgG de ratón (A11005, Molecular Probes). También se utilizó DAPI (Roche) para detectar el ADN nuclear en todas las células fijadas. Las imágenes de inmunofluorescencia fueron adquiridas con el microscopio epifluorescente Zeiss Axioplan2 equipado con una cámara AxioCam MRm camera y las fotos fueron procesadas con el programa AxioVision versión 4.6.3 y Corel Photo-Paint 11.

18.2. Análisis de teratomas mediante tinción de hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica.

Entre los análisis para confirmar la pluripotencia de las iPSCs también se encuentra aquél en el que se demuestra su capacidad para generar tejidos de las tres capas embrionarias. Para la identificación de estas tres capas se analizaron los teratomas formados en ratones inmunodeficientes tras la inyección de estas células. Después de 10-15 semanas los teratomas formados fueron extraídos y transferidos a una solución de formalina al 10% (SIGMA) para su fijación. Posteriormente se prepararon secciones de parafina de cada teratoma y se analizaron histológicamente tanto con la tinción con hematoxilina-eosina, como mediante la utilización de anticuerpos específicos para reconocer tejidos pertenecientes a las tres capas embrionarias.

En este último caso, las secciones de parafina de los teratomas se desparafinaron e incubaron a 95°C en 10 mM de citrato sódico (Merk) a pH 6,0, y Tween 20 (Sigma) durante 30 minutos. Las secciones se lavaron con PBS y se bloquearon con una solución compuesta por PBS, 4% FBS, 0,2% Tritón x100 (MerK) durante 30 minutos a RT. Por último, las preparaciones se incubaron durante toda la noche (O/N) a 4°C con uno de los siguientes anticuerpos para cada preparación: anti-actina *alpha-smooth* muscular-Cy3 monoclonal (C6198, Sigma), ac conejo anti-Brachyury (ab 20680, Abcam), ac conejo anti-FOXA2 (ab40874, Abcam), ac conejo anti- β -III tubulina específica de neurona (ab18207, Abcam) y ac conejo anti-hFANCA (ab5063, Abcam). Al día siguiente se retiraron los anticuerpos primarios y las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios IgG de conejo Alexa Fluor488 generado en cabra para detectar Brachyury, FOXA2 y beta-tubulina III, e IgG de conejo AlexaFluor594 (Molecular Probes A-11037) para detectar hFANCA. Al mismo tiempo se incubaron con DAPI (Roche) para teñir el ADN nuclear.

Las imágenes de inmunofluorescencia se adquirieron tal y como se ha descrito en el subapartado anterior.

19. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD CROMOSÓMICA.

19.1. Análisis de cariotipo y aberraciones cromosómicas.

En primer lugar las células en proliferación se trataron o no con 0,1 μ g/ml de diepoxibutano (DEB) durante un periodo de 72 horas, con el objetivo de generar daño en el ADN. Las células tratadas, en distintos momentos del trabajo, fueron:

- 2×10^5 células CD34⁺, transducidas con VL:sh*control* o VL:sh*7FANCA*.
- iPSCs AF-A corregidas por edición génica, formando colonias en una placa p100 a confluencia (aproximadamente 5×10^6 células).

Para el estudio del cariotipo y de las aberraciones cromosómicas de los diferentes tipos celulares que se quisieron analizar, se realizó un protocolo para la obtención de metafases. Para ello se incubaron las células con colchicina (0,1 μ g/ml para en el caso de células CD34⁺ y 10 μ g/ml para tratar iPSCs, Gibco) durante 4 h en el caso de las iPSCs y 24 h para las CD34⁺ y a 37°C para inhibir la división celular ya que interfiere en la polimerización de los microtúbulos del huso mitótico, seguido por un tratamiento con un medio hipotónico de KCl 0,56% (0,075M) durante 15 minutos a 37°C que someterá a las células a un choque osmótico que permitirá una óptima separación cromosómica.

Posteriormente, las células se fijaron con una solución metanol:acético (3:1 vol/vol) y se lanzaron unos 25 µl de esta solución sobre un porta humedecido previamente con agua caliente para facilitar la expansión de las células. A partir de este momento y dependiendo del objetivo del análisis se siguieron diferentes protocolos para la visualización de las metafases:

1. **Células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺.** Las metafases se tiñeron, tras 12 horas, con 1% Giemsa en tampón fosfato, pH=6,8, y se analizaron de 25 a 40 metafases por muestra para contabilizar las aberraciones cromosómicas entre las que se incluyeron roturas cromosómicas y cromatídicas, fragmentos acéntricos e intercambios entre cromosomas y cromátidas.
2. **iPSCs corregidas por edición génica.** A las 24 horas tras la preparación de los portas con las metafases, se realizó la hibridación del ADN con sondas que nos permitieran detectar e identificar los cromosomas. La hibridación se llevó a cabo según una modificación del procedimiento descrito por Samper y col. [531] y por Estrada y col. [532], utilizando una sonda de ácidos péptido nucleicos (PNA) telomérica marcada con Cy3-LL(CCCTAA)3' y otra sonda para marcar la región alfa-satélite del cromosoma marcada con FITC LL(ATTCTTGGAAACGGGA) (Eurogentec). A continuación se realizaron 3 lavados post-hibridación de 10 minutos cada uno con PBST 0,1 % Tween 20 a 60°C y se deshidrataron mediante lavados seriados de 5 minutos en etanol al 70, 90 y 100%. Las preparaciones se montaron en Vectashield H-1200 con DAPI (Vector Laboratories). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un microscopio Nikon 90i con el objetivo 100X 1.3 N/A plan flour, y una cámara monocroma digital Olympus (Kushima City, Miyazaki, Japan). Las imágenes digitales fueron adquiridas con el programa Cytovision Genus (Genetix, Boston, MA, USA). Se analizaron 20 metafases por cada clon de iPSCs. Para la detección de aberraciones cromosómicas se aplicaron los siguientes criterios:
 - Las roturas cromosómicas o cromatídicas se contabilizaron cuando se observaron huecos en una o dos cromátidas cuyo centrómero correspondiente había sido identificado.
 - Fragmentos cromosómicos: Trozos de cromosomas cuya pertenencia a un cromosoma no había sido fácilmente identificada.
 - Fusiones: Se analizaron los cromosomas que se habían unido por sus extremos (fusión extremo-extremo unidos por sus brazos p, con o sin señales teloméricas, fusión tipo Robertsoniana) o dos cromosomas unidos por sus brazos q (dicéntricos). Las asociaciones teloméricas también se han incluido en esta categoría.
 - Células multiaberrantes: Células con más de una anomalía cromosómica.

19.2. Estudios de alteraciones en iPSCs mediante matriz de CGH.

Para evaluar las posibles alteraciones en las iPSCs modificadas se llevó a cabo un análisis de CGH (del inglés *comparative genomic hybridization*) que evalúa el número de cambios en el número de copias (pérdida o ganancia) de nuestras muestras respecto a una muestra de referencia. Como control de las posibles alteraciones en las iPSCs modificadas genéticamente se utilizaron fibroblastos del paciente AF-A 52, que son las células originalmente utilizadas para llevar a cabo los procesos de

corrección por RH y de reprogramación. Además, como control de referencia también se ha utilizado ADN de un control sano (Promega).

En nuestro caso el ADN genómico de los clones de iPSCs se hibridó utilizando la plataforma KaryoNIM® STEM CELL, diseñada por la empresa NIMGenetics, que consiste en una matriz o array-CGH de 60 000 cebadores distribuidos a lo largo del genoma y dirigidos a detectar las alteraciones genéticas relacionadas con inestabilidad cromosómica (aneuploidías, amplicones y deleciones) que pueden estar presentes en cultivos de células madre humanas destinadas a terapia celular. Esta plataforma permitió, además, analizar datos genéticos de más de 400 genes seleccionados relacionados con el cáncer y la progresión tumoral, entre los que se incluyen genes como U5F1, SOX2, NANOG, MYC, KLF4, LIN28, relacionados con la reprogramación celular.

El análisis bioinformático se realizó utilizando el parámetro ADAM-2 (ventana 0,5 Mb, A=6) para analizar el número de copias de ADN presente para las diferentes sondas. Se aceptó como variación en el número de copias del ADN cuando como mínimo se obtuvo el mismo resultado con 5 sondas consecutivas. El diseño cubrió, al menos con 5 sondas, 395 genes y 20 regiones relacionadas con diagnóstico oncohematológico (<http://sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/>). La resolución del análisis en el resto del genoma fue de aproximadamente 300 kilobases (kb).

20. DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA MEDIANTE LA FORMACIÓN DE CUERPOS EMBRIONARIOS (EB).

Las colonias de iPSCs se desprendieron de la capa de estroma (HFFs) utilizando collagenasa tipo IV (Gibco) a 200 unidades/ml en DMEM KO durante 30 minutos a 37°C. Esta enzima es una proteasa con especificidad por los enlaces entre un aminoácido neutral (X) y la glicina en la secuencia Pro-X-Glyc-Pro que se encuentra preferentemente en el colágeno. En nuestro caso permite la separación de las colonias de iPSCs del estroma. Posteriormente los clones se centrifugaron (200 g, 3 min) y resuspendieron en medio de diferenciación formado por KO-DMEM (Gibco), 20% de FBS no inactivado por calor, 1% de aminoácidos no esenciales –NEAA– (Lonza, Biowhitaker), L-Glu 1mM (Invitrogen), 0,1 mM b-mercaptoetanol (Gibco) y 0,5 ng/ml BMP4 (Prepotech), y se sembraron en placas de pocillos p6 de ultra baja adhesión (*ultra-low attachment plate*, Costar).

Después de dos días y cada 3-4 días a partir de este momento, el medio se reemplazó por un medio formado por Stempro 34 (Invitrogen), 2mM L-Glu (Invitrogen), 40mM MTG (Sigma), 50 µg/ml ácido ascórbico (Invitrogen), 100 ng/ml SCF (EuroBioSciences), 100 ng/ml de ligando Flt3 (EuroBioSciences), 10 ng/ml de IL3 (Biosource), 10 ng/ml de IL6 (Prepotech), 100 ng/ml de TPO (EuroBioSciences), 50ng/ml de BMP4 (Prepotech), 200 ng/ml de Wnt11 (R&D) y 5 ng/ml VEGF (Prepotech). A partir del día 7 el medio fue reemplazado por un medio que contenía los mismos factores que el descrito anteriormente, pero en el que se sustituyó el factor Wnt 11 por 200 ng/ml Wnt3a (R&D) (Fig. 27). Este medio se cambió por un medio fresco con la misma composición a los 3-4 días.

A día 14 y día 21 se realizó el análisis inmunofenotípico de las células diferenciadas tal y como se detalla en el apartado de citometría de flujo (ver material y métodos, apartado 10) y también

fueron utilizadas para la realización de ensayos de unidades formadoras de colonias como se detalla en el apartado 9.2 de esta sección.

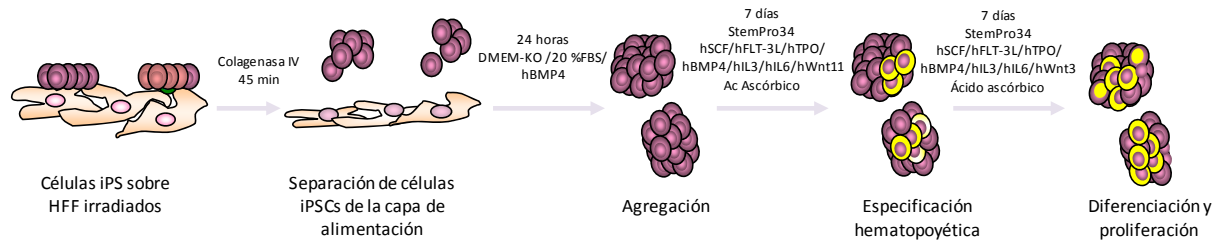


Figura 27. Esquema del proceso de diferenciación hematopoyética. Las colonias de iPSs son despegadas de la capa de alimentación o estroma y son diferenciadas a CPH/CMH utilizando distintas citoquinas.

21. EXPERIMENTOS *IN VIVO*.

21.1. Estudio del injerto de células CD34⁺ interferidas en ratones inmunodeficientes.

Se utilizaron ratones inmunodeficientes NOD/SCID (NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J) o NOG (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ) como receptores, que fueron irradiados con 2,2 Gy ó 1,5 Gy, respectivamente, 24 horas antes del trasplante. Se inyectaron 1×10^6 células no sorteadas ó 5×10^5 células sorteadas por vía intravenosa en la vena coccígea de la cola, utilizando una aguja hipodérmica de 25G x 5/8".

Los análisis del injerto se realizaron a 30, 60, 90 y 120 días tras el trasplante en células obtenidas de la MO del ratón. Para ello se extrajo MO del fémur de los ratones utilizando una aguja hipodérmica de 25G x 5/8" y las células extraídas se analizaron inmunofenotípicamente mediante citometría de flujo (ver material y métodos, apartado 10). Además también se realizaron ensayos clonogénicos con estas células (ver material y métodos, apartado 9.2) (Fig. 28).

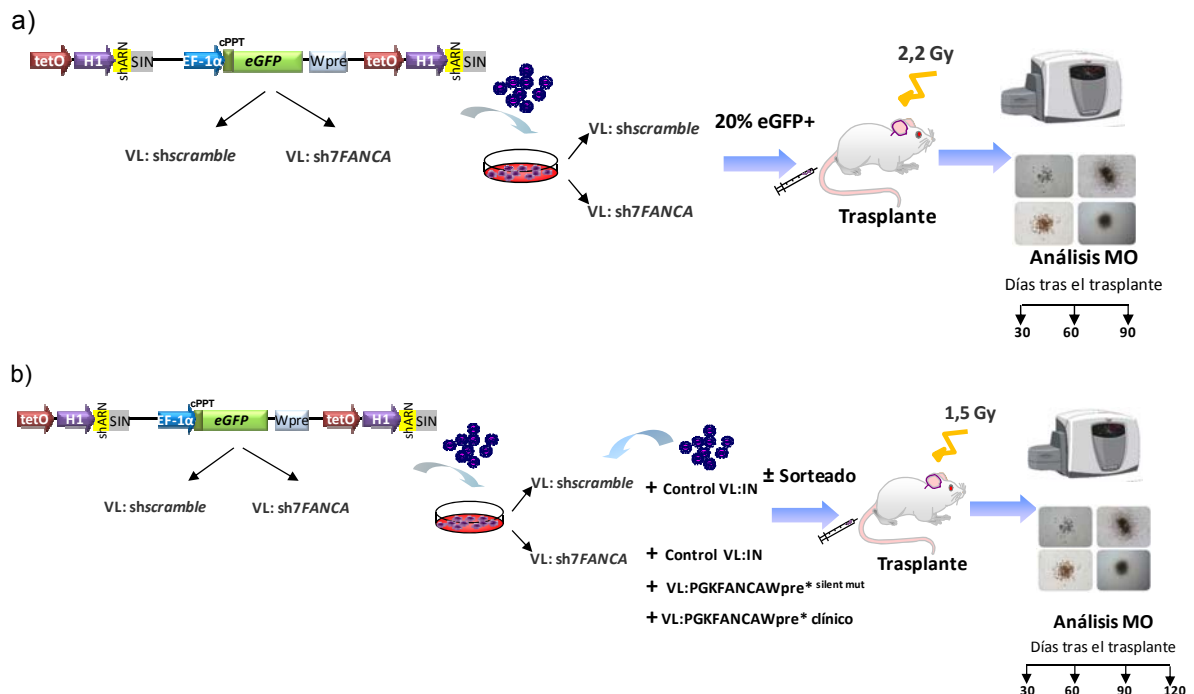


Figura 28. Diagrama representativo de los experimentos *in vivo* con las células CD34⁺ humanas transducidas. a) Esquema de la realización de experimentos de interferencia de *FANCA* con el vector VL:sh7FANCA, su trasplante y posterior análisis. b) Esquema de la realización de experimentos de interferencia de *FANCA* con el vector VL:sh7FANCA, corrección mediante los vectores VL:PGK.FANCA^{silente mut} y VL:PGK.FANCA^{clínico}, injerto en ratones inmunodeficientes y su posterior análisis por citometría de flujo y ensayos clonogénicos.

21.2. Generación de teratomas en ratones NSG con iPSC-AFeg.

Una de las pruebas para verificar el estado pluripotente de las células tras su desdiferenciación es la de la generación de teratomas en ratones inmunodeficientes.

Las iPSCs se levantaron de la matriz celular de HFF mediante el uso de colagenasa de tipo IV (Gibco). Estas células se centrifugaron a 200 g durante 3 minutos y se resuspendieron en 120 μ l de medio CME humanas, al cual se le añadieron 60 μ l de matrigel conservado a 4°C (BD Biosciences). Se inyectaron de $1-3 \times 10^6$ células por ratón utilizando una jeringa con una aguja de 23g 1" (BD) en la parte de atrás del cuello del ratón subcutáneamente, entre los omóplatos del ratón receptor NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ). Después de 6-8 semanas los teratomas formados se extrajeron y se transfirieron a una solución de formalina al 10% (SIGMA) para su fijación. A partir de este momento, los teratomas fueron procesados para la identificación de tejidos de las tres capas embrionarias según se especifica en el apartado 18.2 de esta sección.

22. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico de los datos estos han sido representados como media \pm error típico de la media. Para analizar la presencia de diferencias significativas entre los grupos de estudio, se compararon las medias de los diferentes grupos utilizando la prueba estadística *T-student* para muestras independientes, asumiendo un intervalo de confianza (IC) del 95%.

Por otro lado, previo a la *T-student*, se ha realizado la prueba de *Levene* para la igualdad de varianzas. De modo, que un valor significativo del estadístico (F) supone aceptar la hipótesis nula, y por tanto, la igualdad de varianzas entre muestras. Se ha asumido un Intervalo de Confianza (IC) del 95%.

Para evaluar las diferencias entre poblaciones de pequeño tamaño y con datos no paramétricos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon, también denominada como prueba de suma de rangos Wilcoxon, o prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. Se trata de una prueba no paramétrica con la cual se identifican diferencias entre dos poblaciones basadas en el análisis de dos muestras independientes, cuyos datos han sido medidos al menos en una escala de nivel ordinal. Como nivel de significancia (p) se asumió el valor 0,05.

Todos los análisis estadísticos han sido realizados con el programa IBM® SPSS® Statistics 20 (© Copyright IBM Corporation 1989, 2011).

IV. RESULTADOS

1. GENERACIÓN DE UN MODELO HUMANIZADO DE RATÓN DE AF-A UTILIZANDO VECTORES LENTIVIRALES PORTADORES DE shARNs (VL:shARNs).

1.1. Eficacia de diferentes VL:shARNs para inhibir la expresión de *FANCA* en células sanas.

Estudios iniciales utilizando cinco vectores que expresaban diferentes shARNs dirigidos contra la región 3'UTR y el ADN codificante (ADNc) del gen *FANCA* no mostraron eficacia suficiente en la inhibición del gen *FANCA* para generar un fenotipo de AF en las células humanas MRC5 cultivadas *in vitro* (datos no mostrados, Trabajo de investigación –DEA- 2009).

Por todo ello, nos planteamos utilizar nuevas shARNs dirigidos contra la región de ADN codificante del gen *FANCA*, cuya eficacia inhibitoria había sido ya demostrada en otros tipos celulares, aunque con su expresión dirigida por el promotor U6 [136]. Los denominamos sh6*FANCA*, sh7*FANCA*, sh8*FANCA* y, en nuestro trabajo, su expresión estuvo dirigida por el promotor H1, ya que sus secuencias fueron clonadas en el vector desarrollado en el laboratorio del Dr. Trono, pLVTHM [181]. Además, como vector control se utilizó un vector lentiviral que posee un shARN cuya secuencia no posee una diana conocida en el genoma humano y que será denominado a lo largo del trabajo con el término shcontrol.

1.1.1. Capacidad de expansión disminuida en fibroblastos MRC5 que expresan sh*FANCA*.

En primer lugar, y para estudiar el efecto de los diferentes sh*FANCA* sobre las células humanas, se analizó la proliferación a lo largo del tiempo de células MRC5 transducidas con los diferentes VL:sh*FANCA*.

Se observó que las células que expresaban sh6*FANCA*, sh7*FANCA* o sh8*FANCA* proliferaban de forma similar a lo largo del tiempo y que la tasa de crecimiento era 10 veces menor a la mostrada por las células control transducidas con el vector VL:shcontrol, sugiriendo que los tres sh*FANCA* podrían estar inhibiendo el gen *FANCA* (Fig. 29).

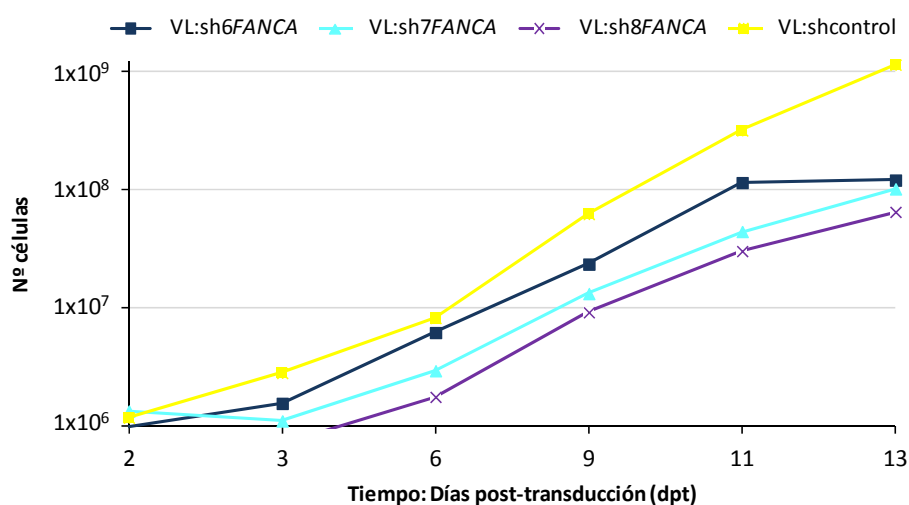


Figura 29. Análisis de la cinética de crecimiento de células MRC5 interferidas en el gen *FANCA*. Las células MRC5 se transdujeron con los vectores VL:shcontrol, VL:sh6*FANCA*, VL:sh7*FANCA* y VL:sh8*FANCA*.

1.1.2. Evolución de la intensidad media de fluorescencia a lo largo del tiempo.

Puesto que los VL:shARNs, además de portar la secuencia de silenciamiento, poseen el gen marcador eGFP, analizamos como variaba la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la proteína eGFP mediante el análisis por citometría de flujo en las células MRC5 transducidas con los diferentes vectores que contenían los shARN (sh6FANCA, sh7FANCA y sh8FANCA). Se puede apreciar que este parámetro presenta un descenso de aproximadamente el 25% en aquellas líneas que tenían la MFI más elevada a 72 horas post-transducción (VL:sh7FANCA y VL:sh6FANCA), disminución que no es observada en las células transducidas con el VL:shcontrol. Esto parece indicar que aquellas células que presentan una expresión más elevada de la proteína eGFP, lo que probablemente corresponde a un mayor número de copias del vector, no son capaces de sobrevivir en cultivo, posiblemente porque la inhibición del gen FANCA es mayor (Fig. 30).

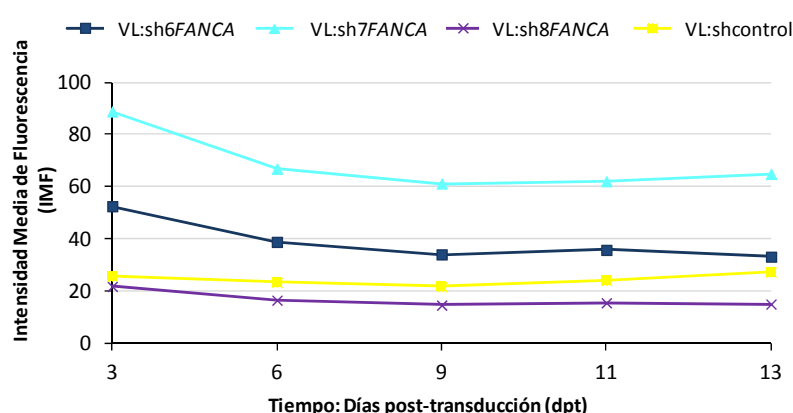


Figura 30. Intensidad media de fluorescencia de la proteína eGFP (IMF) en células MRC5 transducidas con VL:shARNs a lo largo del tiempo. Se muestran valores a lo largo de 13 dpt en células MRC5 transducidas con los vectores VL:sh6FANCA, VL:sh7FANCA, VL:sh8FANCA y VL:shcontrol.

1.1.3. Inhibición de la ruta de AF a nivel molecular.

■ Análisis del ARN mensajero del gen hFANCA mediante PCR cuantitativa.

El siguiente paso fue analizar la expresión del gen FANCA por qPCR en las células MRC5 transducidas con los diferentes VL:shFANCA diseñados. El análisis realizado a 48 horas tras la transducción muestra que la inhibición fue prácticamente del 100% en el caso de las células transducidas con VL:sh6FANCA y VL:sh7FANCA y del 88% cuando se utilizó el VL:sh8FANCA. Para evaluar si la inhibición observada era estable a lo largo del tiempo, se realizó un nuevo análisis a 9 días post-transducción. Los resultados obtenidos señalan que las células que expresan el sh8FANCA no mantienen esta inhibición al mismo nivel que se observó a los 2 días post-transducción; sin embargo, en el caso de las células transducidas con VL:sh6FANCA y VL:sh7FANCA la expresión del gen hFANCA seguía presentando un alto grado de inhibición respecto al control (Fig. 31).

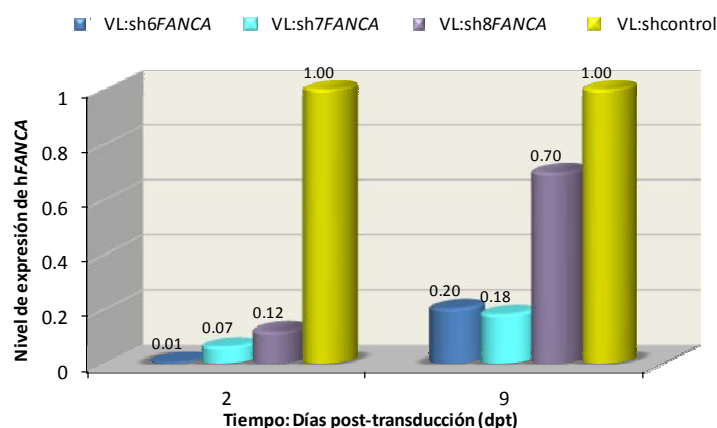


Figura 31. Análisis de expresión de *FANCA* por qPCR en células interferidas en *FANCA*. Estudio del nivel de expresión del gen humano *FANCA* en células transducidas con los distintos VL:shARNs que expresan sh6*FANCA*, sh7*FANCA*, sh8*FANCA* y shcontrol (control) a 2 y 9 días tras la transducción. Los valores de amplificación obtenidos han sido relativizados al control (VL:shcontrol), al cual se le ha asignado el valor máximo de expresión, 1.

■ Análisis de proteína *FANCA* y *FANCD2* monoubiquitinizada por Western Blot.

Tras comprobar que tanto el sh6*FANCA*, como sh7*FANCA* reducían de forma muy significativa la expresión del gen *FANCA* a nivel de ARNm, quisimos comprobar la eficacia de los mismos para reducir los niveles de proteína *FANCA* total y de la fracción *FANCD2* monoubiquitinizada. Recordemos, que es necesaria la presencia de todas las proteínas del core de AF, entre las que se incluye *FANCA*, para que *FANCD2* sea monoubiquitinizada. Es importante resaltar que para la realización de este análisis se utilizaron células MRC5 transducidas con los VL:sh6*FANCA* y VL:sh7*FANCA* sin seleccionar en base a la expresión de eGFP, puesto que estas poblaciones mostraban valores porcentajes de transducción cercanos al 95%. En el caso de las células MRC5 transducidas con el VL:sh8*FANCA* el porcentaje de células eGFP positivas fue del 40%, por tanto, además de ser analizadas sin seleccionar, se seleccionaron mediante un separador celular para obtener una población altamente enriquecida en células que expresaban eGFP (> del 85%).

En la figura 32 se puede observar que, tras 18 dpt, existía prácticamente una reducción total de la proteína *FANCA* en las células transducidas con el VL:sh7*FANCA*. Lo mismo ocurrió con la proteína *FANCD2* monoubiquitinizada, que se vió muy disminuida respecto al resto de células transducidas con los distintos shARNs estudiados y respecto al control.

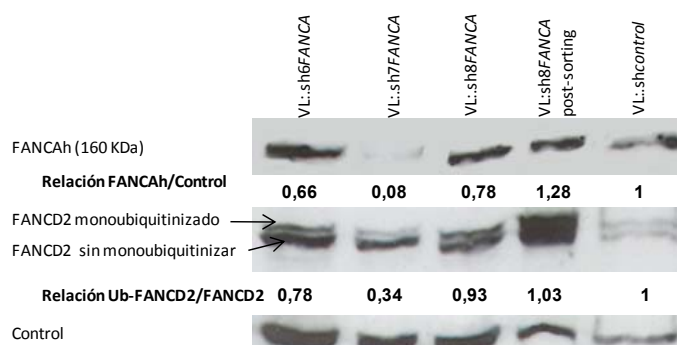


Figura 32. Análisis de proteínas *FANCA* y *FANCD2* monoubiquitinizado en células MRC5 transducidas con los VL:shARNs. Cuantificación del nivel de proteínas *FANCA* y *FANCD2* monoubiquitinizada en células MRC5 transducidas con vectores que expresan sh6*FANCA*, sh7*FANCA*, sh8*FANCA* (células sin seleccionar y seleccionadas) y shcontrol. Los extractos proteicos se recogieron a 18 dpt y la proteína se analizó por WB y marcaje con anticuerpos específicos de *FANCA* humano y *FANCD2*. Los datos se expresan, en el caso de *FANCA*, como la relación entre *FANCA* y el control de carga (vinculina) y en el caso de *FANCD2* como la relación entre la banda monoubiquitinizada (166KDa) y la banda no monoubiquitinizada (163KDa). Los resultados se han relativizado a las células MRC5 transducidas con el VL:shcontrol, a las cuáles se le ha asignado el valor 1.

Puesto que la proteína FANCA es necesaria para la monoubiquitinización de FANCD2 comprobamos mediante WB de FANCD2 que la inhibición de FANCA impedía la expresión de la forma de FANCD2 monoubiquitinizada (Fig. 32). Al igual que ocurría con la expresión del ARNm de *FANCA*h, el mayor nivel de inhibición fue observado cuando se expresaba sh7FANCA, aunque, a menor nivel, el sh6FANCA también fue capaz de reducir los niveles de proteína de FANCA y FANCD2.

1.1.4. Inhibición de la ruta de AF a nivel funcional: Ausencia de focos nucleares de FANCD2.

Para confirmar los resultados anteriores en los que se mostraba una inhibición de FANCA tanto a nivel proteico como de ARNm, se evaluó la inhibición de la ruta con un ensayo funcional que consistió en estudiar si la capacidad de FANCD2 para movilizarse a los sitios de reparación (focos nucleares) también se vería afectada. Para ello se analizó, mediante inmunofluorescencia, el número de focos de FANCD2 tanto en presencia como ausencia de MMC. En la figura 33 se observa que el porcentaje de células con focos de FANCD2 no supera el 5% en el caso de las células transducidas con VL:sh6FANCA, efecto aún más acentuado en el caso de la utilización del vector VL:sh7FANCA donde la movilización de FANCD2 a los sitios de reparación era prácticamente nula, tanto en ausencia como en presencia de MMC, lo cual contrasta significativamente con lo observado en células tratadas con el shcontrol y MMC donde el porcentaje de células con focos de FANCD2 alcanzó valores de alrededor del 50%.

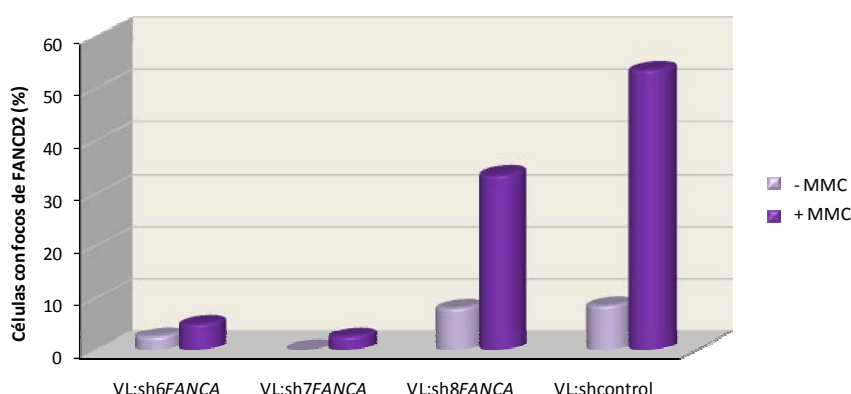


Figura 33. Representación del porcentaje de focos nucleares de FANCD2 en células MRC5 transducidas con los vectores que expresan sh6FANCA, sh7FANCA, sh8FANCA y shcontrol tanto en ausencia como en presencia de MMC. Se observa una clara inhibición de la movilización de FANCD2 a los sitios de reparación en células que expresan sh6FANCA y sh7FANCA.

Observando las imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia podemos confirmar que, en presencia de MMC, las células que expresan el vector VL:sh6FANCA y VL:sh7FANCA, y por tanto la proteína eGFP (células verdes) son aquellas en los que no se observó presencia de focos en el núcleo (marcados en rojo) (Fig. 34). Por otro lado, las células no transducidas presentaron focos de FANCD2 en porcentajes similares a las células control. Además, las células que fueron transducidas con el vector VL:sh8FANCA presentaron un número de focos de reparación en presencia de MMC más elevado que el observado en células tratadas con los otros shARNs, lo que confirma los resultados anteriores en los que se demuestra que el VL:sh8FANCA no fue capaz de inhibir la expresión del gen FANCA de forma significativa.

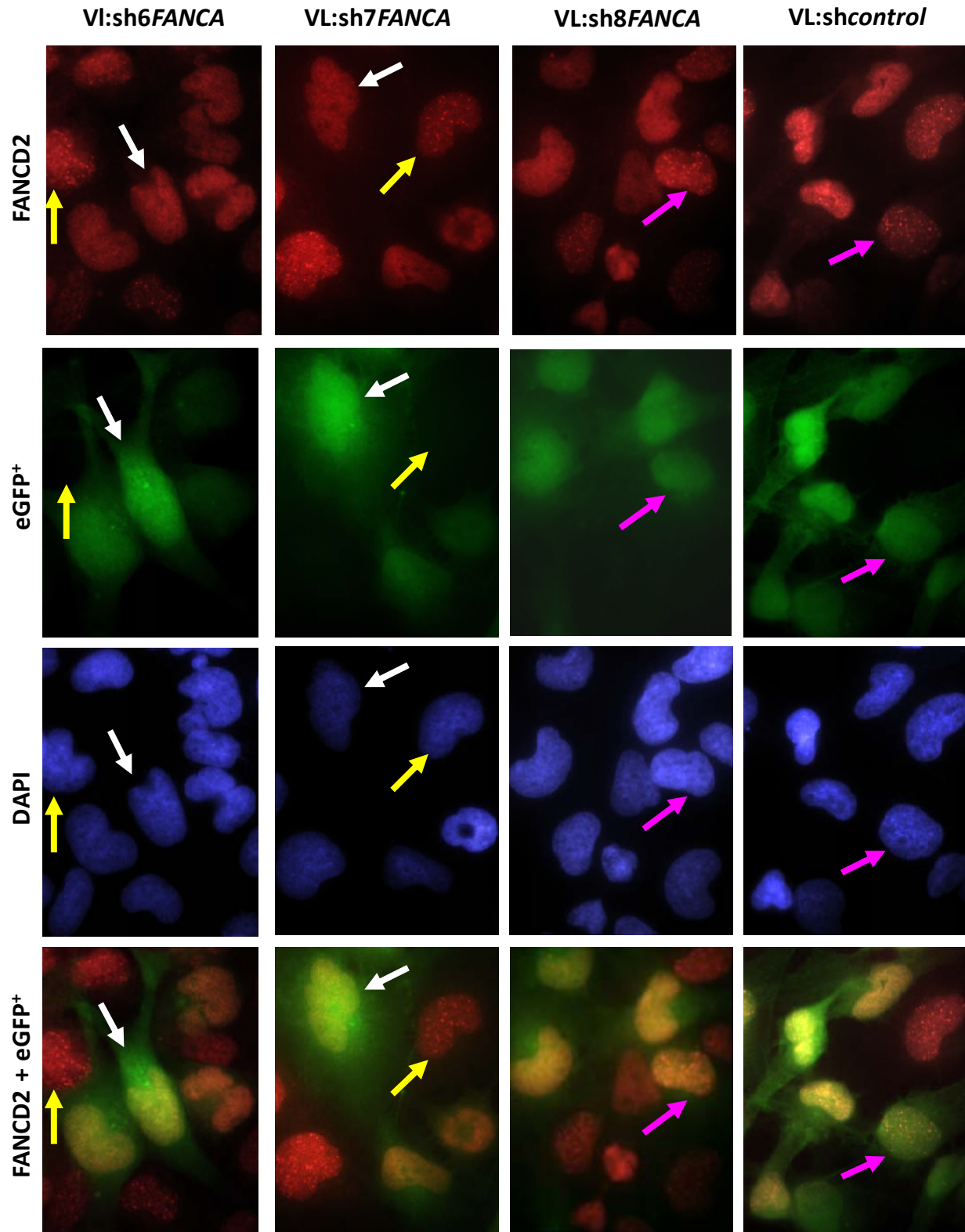


Figura 34. Análisis de inmunofluorescencia de células MRC5 transducidas con VL:sh6FANCA, VL:sh7FANCA, VL:sh8FANCA y VL:shcontrol. El marcaje con el anticuerpo anti-FANCD2 (Texas Red) muestra el número de focos FANCD2 presentes por núcleo. El color verde, gracias a la expresión de la proteína eGFP, indica qué células están transducidas. Los núcleos se muestran azules por tinción con DAPI. La visión conjunta de Texas Red y eGFP nos permite colocalizar a las células transducidas con la presencia o no de focos. Se observa que en las células que expresan sh6FANCA y sh7FANCA no existen focos FANCD2 en las células verdes (expresan el shARN).

1.2. Inhibición de *FANCA* mediante VL:shARNs en progenitores hematopoyéticos CD34⁺ de sangre de cordón umbilical.

Puesto que el sh7*FANCA* demostró una mayor eficacia para silenciar la expresión del gen *FANCA*, se eligió este vector para llevar a cabo la inhibición de la ruta de AF en células progenitoras hematopoyéticas humanas CD34⁺. En el siguiente bloque de resultados evaluamos *in vitro* el fenotipo de estas células transducidas con el VL:sh7*FANCA*. A partir de este momento, también nos referiremos a estas células como CD34⁺ interferidas.

1.2.1. Inhibición de focos nucleares de reparación de FANCD2 en células CD34⁺ interferidas.

Al igual que en la línea celular MRC5 se estudió la inhibición de la ruta de AF en progenitores hematopoyéticos CD34⁺ transducidos con VL:sh7*FANCA* mediante el análisis de los focos de reparación de FANCD2. Se pudo observar que la expresión de sh7*FANCA* en estas células inhibía, de forma significativa, la formación de focos FANCD2 en comparación con las células que expresaban el vector control (CD34⁺ control), tanto en ausencia como en presencia de MMC. Esto confirma el silenciamiento del gen *FANCA* y, por tanto, el fallo en la ruta de AF (Fig. 35a). Además, como se puede observar en la figura 35b, en un conjunto de células en las que no se seleccionó la población eGFP⁺, sólo aquellas que expresaban este gen marcador, y por lo tanto el sh7*FANCA*, eran las que no formaron focos de FANCD2, mientras que las células que no habían sido transducidas sí que poseían esta ruta funcional y, por lo tanto, son capaces de movilizar FANCD2 a los focos de reparación.

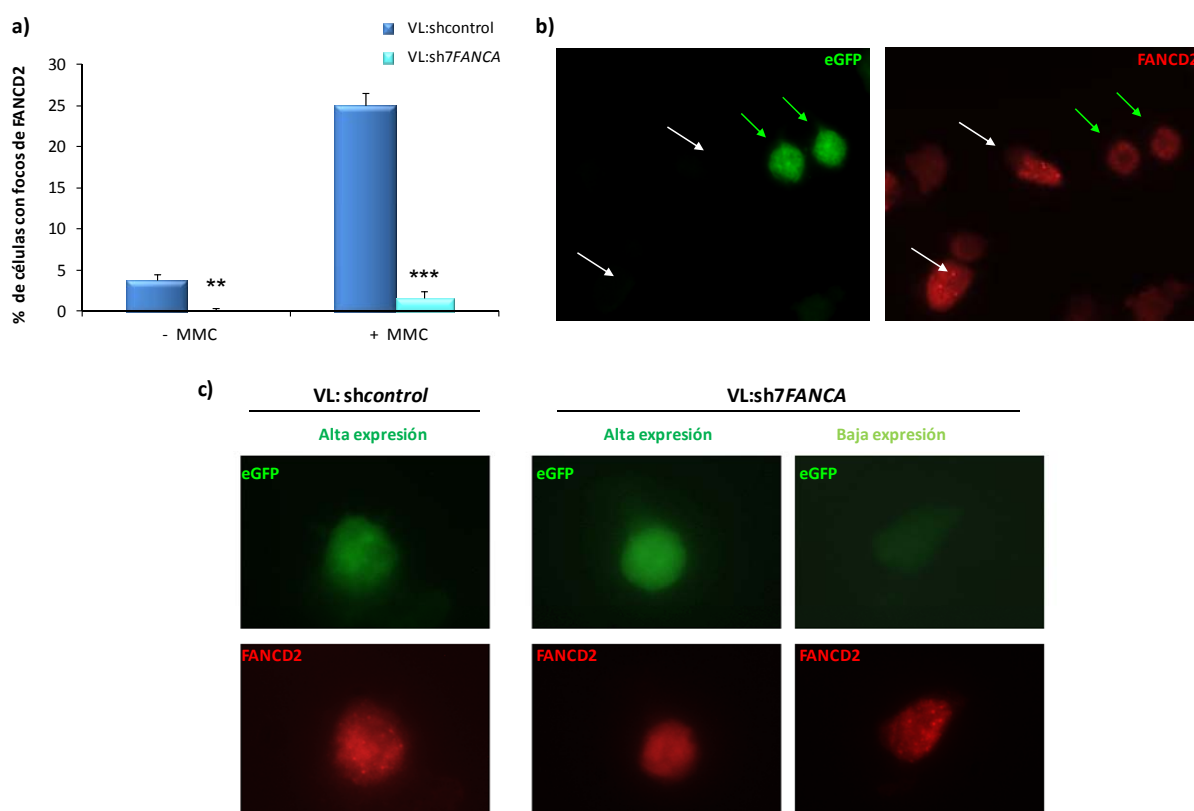


Figura 35. Formación de focos nucleares de FANCD2 en células CD34⁺ transducidas con VL:shcontrol y VL:sh7*FANCA*. **a)** Representación gráfica de la media del porcentaje de focos de FANCD2 (n=3). ** p<0,01 y ***p<0,001. **b)** Imágenes de inmunofluorescencia de una población de células CD34⁺ transducidas con VL:sh7*FANCA* y no seleccionadas. Las flechas blancas indican células no transducidas (eGFP⁻) y por lo tanto, que presentan focos de FANCD2. Las flechas verdes indican células que coexpresan eGFP (verde) y sh7*FANCA*, por lo que no son

capaces de movilizar a FANCD2 (rojo) a los focos de reparación en el núcleo. **C)** Inmunofluorescencia para la detección de focos FANCD2 en núcleos de CD34⁺ transducidas con VL:shcontrol (izquierda), alto número de copias de VL:sh7FANCA (centro) y bajo número de copias de VL:sh7FANCA (derecha). Se puede observar distintos niveles de presencia de focos de FANCD2 dependiendo del nivel de expresión del vector VL:sh7FANCA.

Es importante señalar que en nuestros estudios se pudo apreciar que el nivel de interferencia logrado del gen *FANCA* era proporcional a la expresión del VL:sh7FANCA, medida como eGFP, puesto que ambos ADNc se coexpresan. Esto queda patente en la figura 35c en la que se observa que en aquellas células en las que había una elevada expresión de eGFP y, por tanto, de shFANCA, no había formación de focos FANCD2; mientras que las células con una baja expresión de eGFP -lo que conlleva una menor expresión del interferente- no fueron capaces de inhibir la ruta de AF totalmente, presentando focos de FANCD2 en sus núcleos.

Por ello, en el resto de los experimentos se seleccionaron las células mediante un separador celular por citometría de flujo para obtener una población de células CD34⁺ con una alta expresión de eGFP y, en consecuencia, del sh7FANCA, para así conseguir una inhibición prácticamente total de la ruta de AF.

1.2.2. Capacidad de formación de colonias hematopoyéticas de células CD34⁺ interferidas en FANCA.

Se ha descrito previamente que la MO de pacientes con AF muestra un número disminuido de progenitores hematopoyéticos (PHs) en comparación con el existente en la MO de donantes sanos, alcanzando valores de hasta el 80% de reducción [533]. Por ello, se analizó la capacidad de generación de PHs *in vitro* a partir de las células CD34⁺ en las que se había interferido el gen *FANCA*. Mediante cultivo clonogénico, se observó que había una ligera disminución, del 12,5%, en la capacidad de generación de PHs a partir de las CD34⁺ interferidas en comparación con las CD34⁺ control que expresaban el shcontrol (Fig. 36a). Sin embargo, cuando replaqueamos estas colonias primarias en nuevas placas de metilcelulosa con el objetivo de analizar el comportamiento de progenitores sometidos a estrés proliferativo, observamos una significativa reducción en la formación de colonias que alcanzó valores de hasta el 90% (Fig. 36b).

Este comportamiento emula lo que ocurre en la MO de pacientes de AF, indicando que el estrés inducido por el cultivo *in vitro* produce en las células interferidas un efecto similar al estrés sufrido por las células de los pacientes durante la evolución de la enfermedad.

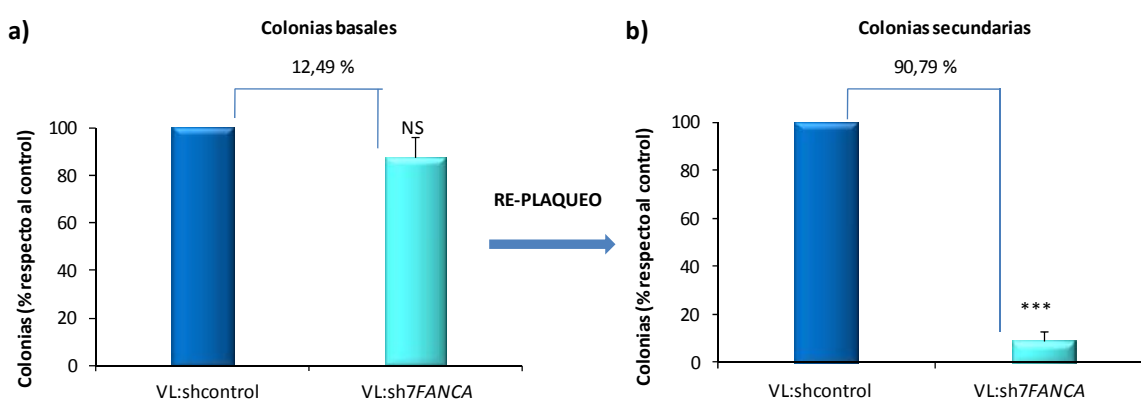


Figura 36. Capacidad de formación de colonias hematopoyéticas a partir de células CD34⁺ interferidas. a) Porcentaje de colonias basales a partir de células CD34⁺ interferidas en comparación con células CD34⁺ control. n=9. **b)** Porcentaje de colonias secundarias obtenidas

después del replaqueo de colonias primarias. El % de colonias a partir de PHs interferidos se vio claramente reducido cuando se replaquearon las colonias basales. n=6. Las barras de error representan el error típico de la media. NS: No significativo, ***p<0,001

1.2.3. Sensibilidad a agentes entrecruzantes del ADN.

Otra de las características de las células de AF es la hipersensibilidad que muestran a agentes entrecruzantes del ADN, tales como la MMC. Al igual que ocurre en el caso de los PHs de pacientes con AF, las células CD34⁺ que expresaban el sh7FANCA presentaron *in vitro* una alta sensibilidad a MMC en comparación con aquéllas que expresaban el shcontrol (Fig. 37).

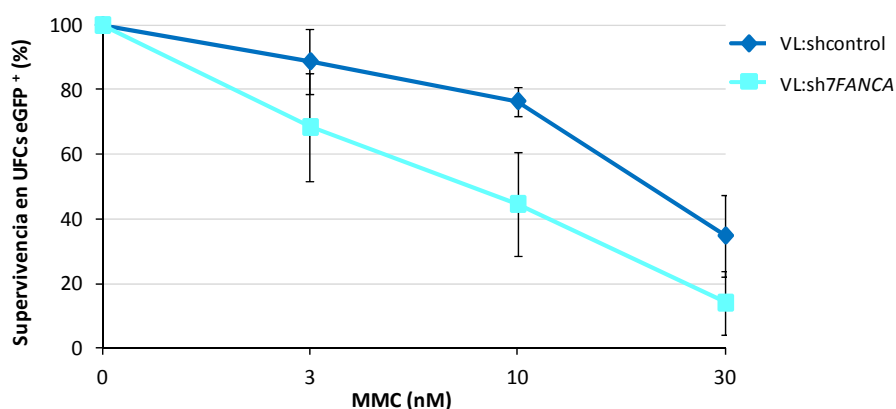


Figura 37. Sensibilidad a MMC en colonias generadas a partir de CD34⁺ interferidas en FANCA. Porcentaje de colonias eGFP⁺ viables tras la exposición a diferentes dosis de MMC. Los datos son la media de 4 experimentos independientes (n=4). Las barras de error representan el error típico de la media.

1.2.4. Estudio de la inestabilidad cromosómica en presencia de Diepoxibutano (DEB).

Otra característica distintiva de las células procedentes de pacientes con AF es la tendencia a presentar aberraciones cromosómicas tras la exposición a agentes que producen entrecruzamientos en el ADN, como el diepoxibutano (DEB) [82, 534]. En la figura 38 podemos observar que el porcentaje de células CD34⁺ que poseen aberraciones cromosómicas en presencia de DEB está notablemente incrementado en el caso de aquellas células que habían sido transducidas con el VL:sh7FANCA en comparación con aquellas que expresaban el shcontrol.

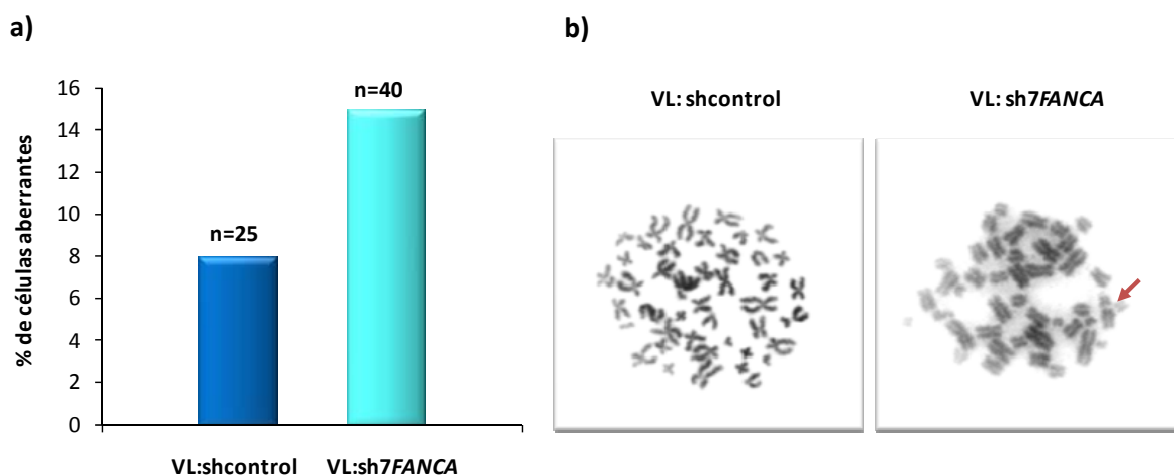


Figura 38. Aberraciones cromosómicas en células CD34⁺ transducidas con el VL:shcontrol o el VL:sh7FANCA. a) En el caso de las células CD34⁺ interferidas con VL:shcontrol se contabilizaron 25 células y 40 en el del VL:sh7FANCA y se observó un claro incremento en el porcentaje de células aberrantes cuando éstas expresaban el sh7FANCA. b) Microfotografías correspondientes a dos metafases de células CD34⁺ que expresan o bien el VL:shcontrol o el VL:sh7FANCA. La flecha roja indica un ejemplo de rotura cromosómica.

1.2.5. Sensibilidad al TNF α .

La citoquina TNF α está implicada en la etiología del fallo de MO y la progresión al cáncer en pacientes con AF [96, 98, 535, 536]. Así se ha observado que los progenitores hematopoyéticos de pacientes con AF son hipersensibles a la exposición a esta citoquina, de modo que se produce una pérdida de éstos por apoptosis [536]. Para evaluar si las células CD34⁺ interferidas reproducen esta característica, se analizó la respuesta de estas células a diferentes concentraciones de TNF α . En la figura 39a se muestra que la capacidad de expansión *in vitro* de las células CD34⁺ interferidas, disminuida ya de forma basal respecto a las CD34⁺ control (expresan *shcontrol*), es menor cuando estas células estaban expuestas a una dosis mantenida de TNF α de 10ng/ml; efecto que no fue observado en las células CD34⁺ control.

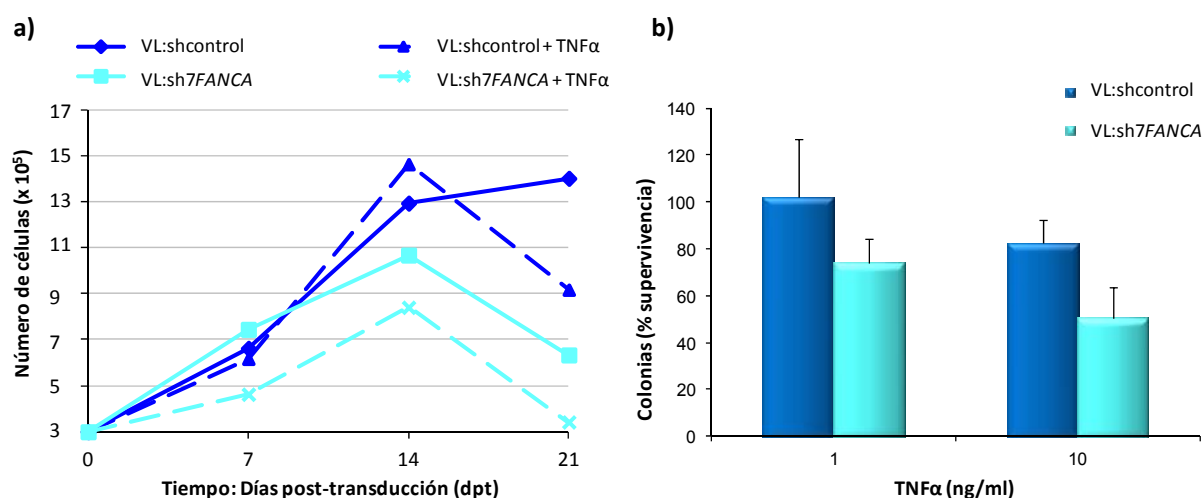


Figura 39. Efecto del TNF α en células CD34⁺ transducidas con VL:shcontrol y VL:sh7FANCA. a) Capacidad de expansión de las células CD34⁺ control e interferidas en ausencia y presencia de TNF α (10 ng/ml). **b)** Supervivencia de colonias generadas a partir de progenitores hematopoyéticos control e interferidos para *FANCA* en presencia de diferentes dosis de TNF α (1 y 10 ng/ml). Los valores mostrados están relativizados respecto a las células sin tratar. Las barras de error representan el error típico de la media (n=4).

Además, se evaluó la capacidad de los progenitores hematopoyéticos para generar colonias hematopoyéticas en presencia de dos dosis crecientes de TNF α (1 y 10 ng/ml). Como se muestra en la figura 39b las células que expresaban el *sh7FANCA* fueron significativamente más sensibles a esta citoquina respecto a las células CD34⁺ transducidas con el VL:shcontrol.

1.2.6. Estudio de la parada del ciclo celular y apoptosis.

La MMC, además de reducir la supervivencia de las células de AF, induce la parada de ciclo en fase G2/M [85], por lo que la evaluación de la parada de ciclo en fase G2/M por citometría de flujo ha sido utilizada también como prueba diagnóstica [86]. Por ello, se analizó si esta característica se observaba también en las células interferidas en *FANCA*.

Los resultados obtenidos mostraron que las células CD34⁺ transducidas con el vector VL:sh7FANCA no presentaban la típica parada en G2/M observada, por ejemplo, en fibroblastos de pacientes de AF tras ser sometidas a daño por MMC. Merece la pena reseñar, que tras el análisis de la literatura, en células CD34⁺ de pacientes AF esta parada no existe o no se ha observado (Fig. 40).

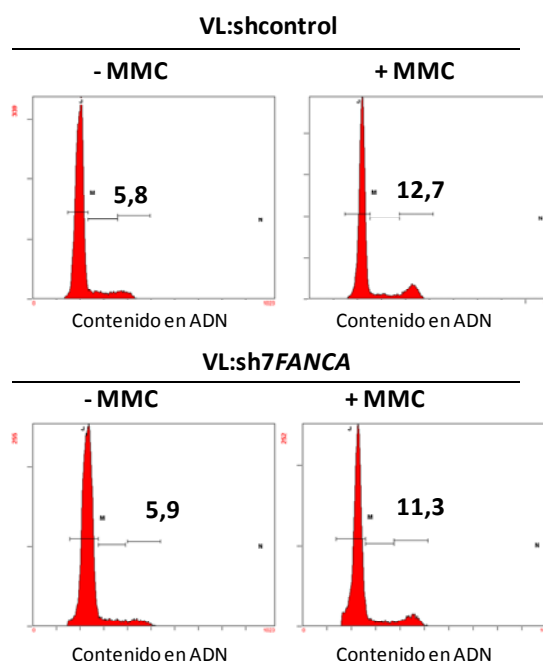


Figura 40. Estudio del ciclo celular en las células CD34⁺ transducidas con VL:shcontrol o VL:sh7FANCA mediante citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células interferidas que se acumulan en fase G2/M tanto en presencia como en ausencia de MMC en comparación con las células control.

Puesto que nuestras células interferidas no reproducían la parada de ciclo observada en células AF, estudiamos si esto pudiera ser debido a que la MMC no inducía daño suficiente en la célula para que ocurriera, aunque sí es cierto que este daño era suficiente para que se generaran menos GMs a partir de progenitores hematopoyéticos interferidos en comparación con las células control. Por ello estudiamos el posible incremento de roturas de doble cadena (DSBs) generadas en las células CD34⁺ interferidas

Para estudiar el efecto genotóxico debido a la acción de la MMC, se analizó la fosforilación de H2AX, ya que este evento es uno de los primeros marcadores indicativos de daño celular ya que se fosforila, pasando de la histona H2AX a γ H2AX, tras la formación DSBs. Además, esta proteína participa en la activación de otras proteínas implicadas en la parada del ciclo celular.

Nuestros resultados mostraron que existía un aumento en la expresión de γ H2AX en las células CD34⁺ transducidas con VL:sh7FANCA, tanto en presencia como en ausencia de MMC, lo que indicaba un aumento de las DSBs (Fig. 41a). Es decir, la MMC inducía daño en el ADN de las células interferidas, aunque esto no se tradujera en una parada de ciclo.

Además, también se estudió el nivel de apoptosis que presentaban estas células para justificar si la ausencia de parada en la fase G2/M era debida a que las células entraban directamente en apoptosis. La muerte celular se reflejó como la fracción sub-G1 que representa los fragmentos nucleares medidos por citometría de flujo. En la figura 41b se observa que las células CD34⁺ que expresan sh7FANCA muestran un mayor porcentaje de apoptosis (fase sub-G1) que las células control, tanto en presencia como ausencia de MMC, donde el porcentaje de células en apoptosis duplicaba al obtenido en células control.

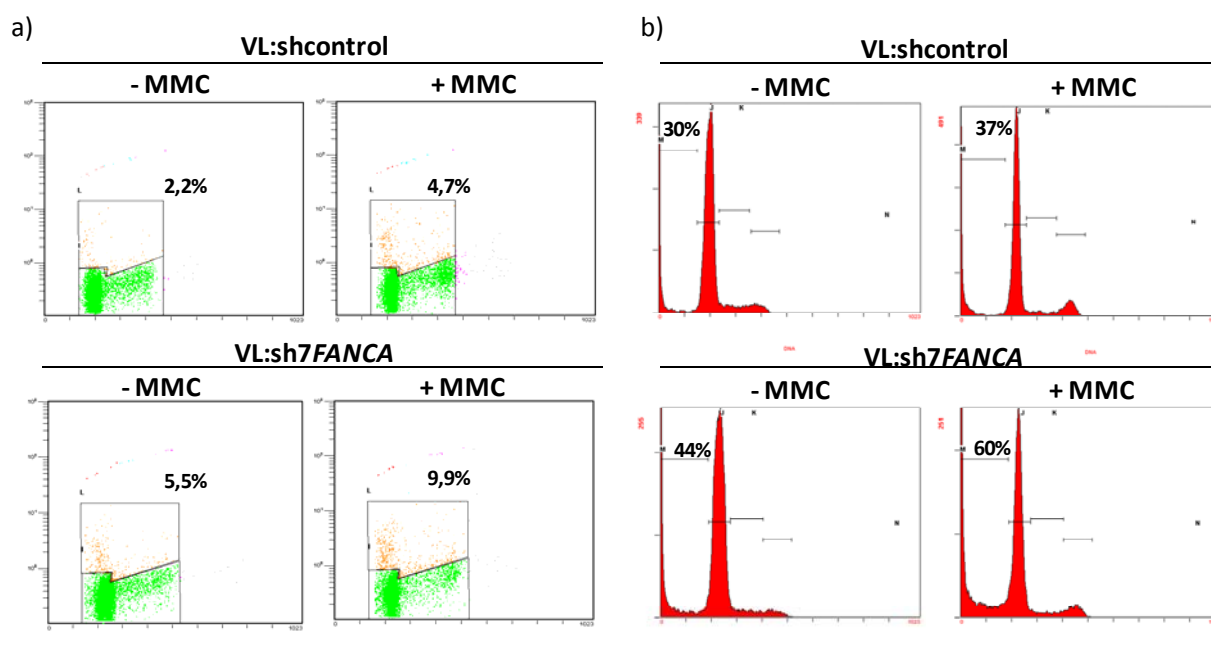


Figura 41. Análisis del efecto de la interferencia de *FANCA* sobre la generación de DSBs y apoptosis en células CD34⁺. a) Estudio del efecto genotóxico de la MMC cuantificado mediante expresión de γ H2AX en células CD34⁺ que expresan el shcontrol o sh7FANCA en presencia de MMC. b) Estudio de apoptosis mediante el análisis de la fase sub-G₁ en células CD34⁺ que expresan el shcontrol o sh7FANCA en presencia de MMC.

1.3. Desarrollo de un modelo humanizado de AF: Trasplante de células CD34⁺ interferidas en *FANCA* en ratones inmunodeficientes.

Una vez que se confirmó *in vitro* que las células CD34⁺ transducidas con VL:sh7FANCA reproducían la mayoría de las características observadas en células de pacientes AF, decidimos desarrollar un modelo humanizado de la enfermedad mediante el trasplante de células CD34⁺ interferidas en ratones inmunodeficientes. En este modelo se estudió la capacidad de injerto de estas células y su potencial de repoblación a lo largo del tiempo. Hay que resaltar que hasta la fecha no se ha logrado repoblar *in vivo* ratones inmunodeficientes con células de MO procedentes de pacientes AF de manera reproducible, por lo cual este modelo representaría una nueva herramienta para el estudio de células hematopoyéticas con fenotipo AF *in vivo*.

1.3.1. Capacidad de injerto de células humanas CD34⁺ interferidas en *FANCA*.

Para analizar el comportamiento de células con fenotipo de AF *in vivo*, trasplantamos CD34⁺ de sangre de cordón transducidas bien con el VL:shcontrol o el sh7FANCA en ratones inmunodeficientes NOD/SCID. Las células trasplantadas estaban transducidas a un nivel del 20% y se realizaron análisis del porcentaje de injerto evaluando la proporción de células eGFP⁺ dentro de la población de células humanas CD45⁺ (marcador hematopoyético panleucocitario). El estudio del injerto humano se realizó a 30, 60 y 90 días tras el trasplante, mediante punción medular y se analizó por citometría de flujo.

El primer dato de interés observado fue que a 30 días tras el trasplante, tanto las células no interferidas como las que sí lo estaban, podían injertar en ratones NOD/SCID (Fig. 42).

No obstante, mientras que el porcentaje de injerto fue aumentando a lo largo del tiempo en ratones trasplantados con células progenitoras hematopoyéticas transducidas con el vector control

(Fig. 42a), la tendencia en el caso de las células transducidas con VL:sh7FANCA fue la contraria, pues en estos ratones el porcentaje de injerto disminuyó a lo largo del tiempo post-trasplante (Fig. 42b). Este resultado mimetiza el fallo de MO observado en los pacientes y resalta, junto con la observación *in vitro* de la disminución de la generación de colonias secundarias, la necesidad de inducir un estrés proliferativo en las células interferidas para detectar un fenotipo pronunciado. Este conjunto de resultados sugiere que el modelo desarrollado constituye una nueva herramienta experimental de interés para estudiar diferentes aproximaciones terapéuticas para la enfermedad.

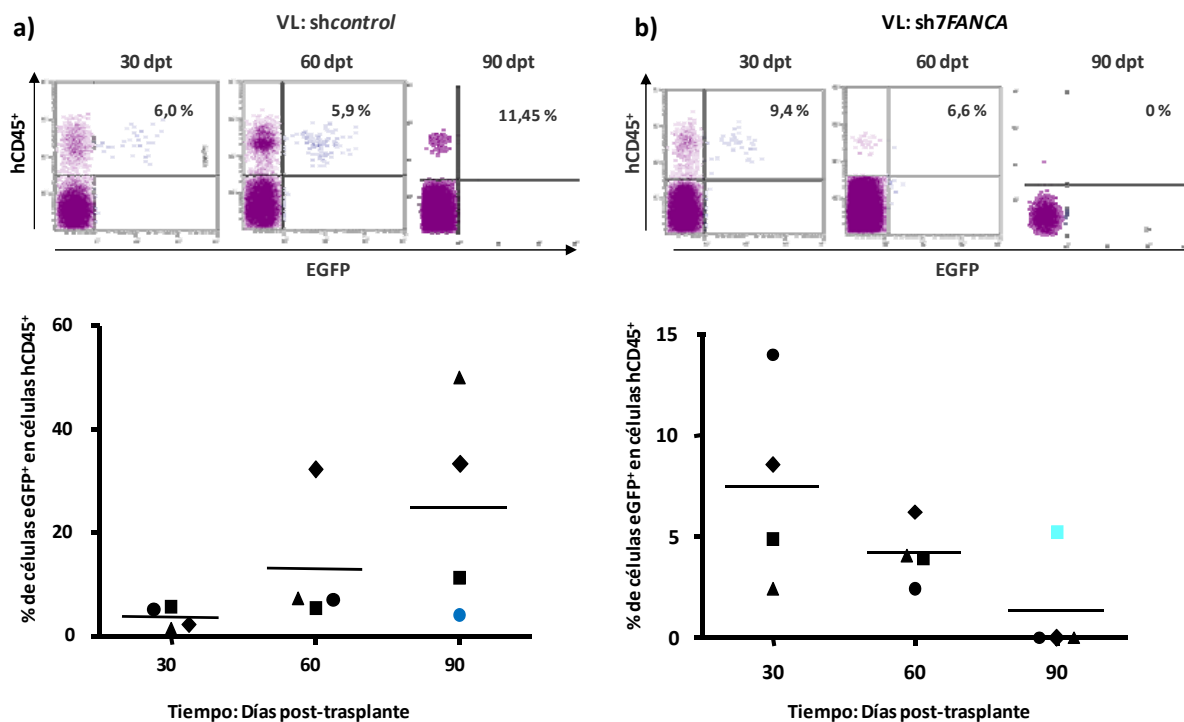


Figura 42. Análisis del injerto de células CD34⁺ de sangre de cordón transducidas con VL:shARN en ratones inmunodeficientes. La evolución del porcentaje de células eGFP⁺ en el injerto humano (células que expresan hCD45⁺) fue creciente en el caso de las células que expresaban el shcontrol y decreciente cuando expresaba el sh7FANCA. Cada punto corresponde a un ratón y se realizaron análisis del injerto en MO a 30, 60 y 90 días. NOTA: Los puntos en color azul indican los ratones de los cuáles se obtuvieron células de MO para la realización de los experimentos explicados en el apartado 1.3.2.

1.3.2. Caracterización fenotípica de los PHs obtenidos de ratones trasplantados con células CD34⁺ interferidas.

Para confirmar que la interferencia del gen *FANCA* se mantenía *in vivo* y no se habían seleccionado células que no estuvieran interferidas por su desventaja frente a aquellas células no interferidas, a 90 días tras el trasplante se estudió el nivel de expresión de *FANCA* en las células obtenidas de los dos ratones transducidas con el vector VL:sh7FANCA y el vector control.

■ Sensibilidad a MMC de los Progenitores Hematopoyéticos interferidos.

Para responder a la pregunta de si la interferencia seguía siendo efectiva en los PHs tras haber sido injertados en los ratones se extrajo MO de los dos ratones señalados en azul en la figura 42. Se estudió su capacidad de generar UFCs en metilcelulosa con factores humanos y de sobrevivir a la exposición a diferentes dosis de MMC (0, 10 y 30 nM). En la figura 43a se puede observar que en ausencia de MMC (en estado basal), a 90 días post-trasplante el número de progenitores eGFP⁺ es significativamente menor en el caso de células interferidos respecto a los controles, a pesar de que el

porcentaje inicial de injerto de las células transducidas fue similar en las dos condiciones. Esto confirma que la presencia de un estrés induce la pérdida de los PHs interferidos, tal y como ocurre en los pacientes de AF. Asimismo, los resultados obtenidos muestran que las células eGFP positivas obtenidas de un ratón trasplantado durante 90 días con CD34⁺ interferidas para *FANCA* son sensibles al tratamiento con MMC en comparación con aquellos PHs obtenidos de ratones trasplantados con células transducidas con el vector control (Fig. 43b).

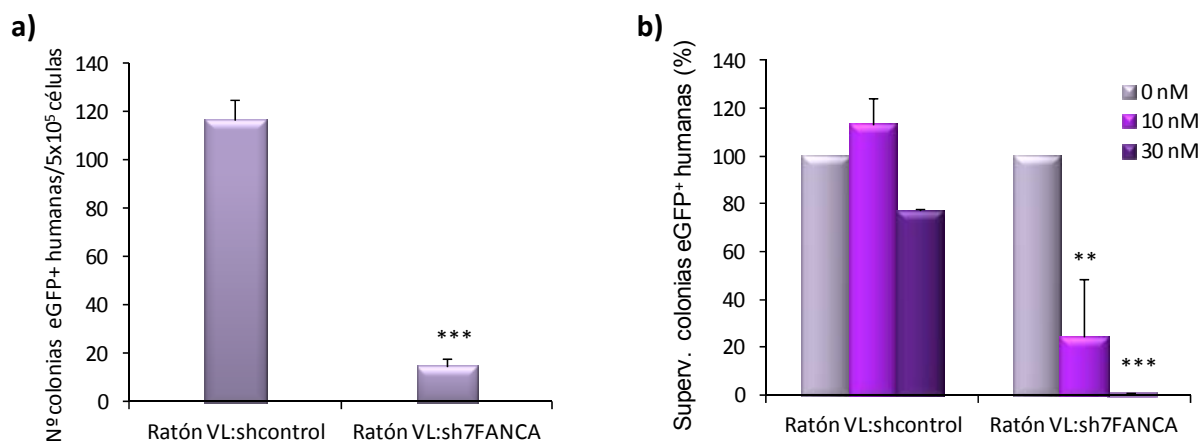


Figura 43. Cuantificación de colonias procedentes de la MO de ratones inmunodeficientes a 90 días post-trasplante con células interferidas. a) Las células extraídas de MO de un ratón trasplantado con CD34⁺ transducidas con el VL:sh7FANCA y otro con CD34⁺ transducidas con el VL:shcontrol fueron cultivadas en metilcelulosa específica para células humanas y se observó una disminución en el número de colonias eGFP⁺ humanas procedentes de PHs interferidos (n=3). Las barras de error representan el error típico de la media. NS: No significativo, ***p<0,001 b) El tratamiento con dosis crecientes de MMC mostró una reducción en la supervivencia de las UFCs en el caso de las células obtenidas del ratón trasplantado con CD34⁺ expresando el VL:sh7FANCA, respecto a los ratones trasplantados con células control (n=3). Los porcentajes de supervivencia de las Colonias tratadas con MMC (10 y 30 nM) están relativizados a su control sin tratar (0 nM). Las barras de error representan el error típico de la media. NS: No significativo, ***p<0,001.

■ Análisis por qPCR de la expresión de hFANCA.

Por otro lado, se estudió la expresión de hFANCA en las colonias obtenidas en la figura 43, para comprobar que los niveles de expresión de este gen seguían estando disminuidos en las células obtenidas de ratones previamente trasplantados con CD34⁺ VL:sh7FANCA. En la figura 44 se observa que el nivel de expresión de hFANCA es significativamente menor en el caso de las células interferidas respecto a las células control, confirmando la persistencia de la inhibición del gen *FANCA* a lo largo del tiempo.

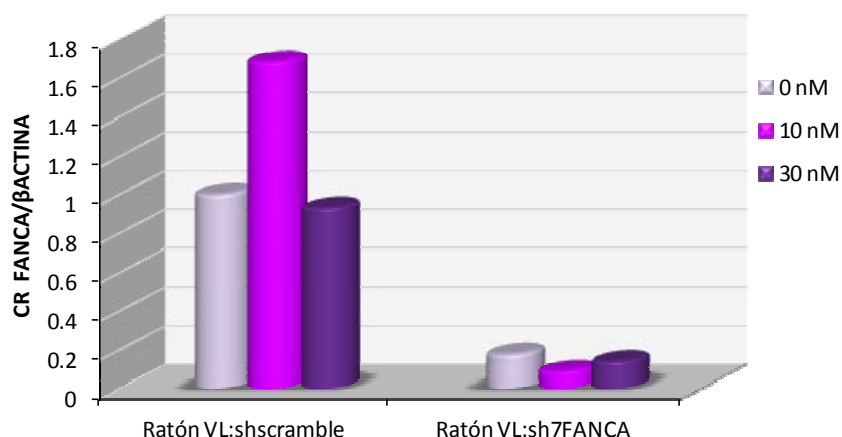


Figura 44. Expresión de hFANCA en células procedentes de colonias eGFP⁺ control o interferidas en FANCA. Se muestra la cantidad relativa (CR) de FANCA, ya que los valores obtenidos se relativizaron tanto a la β -actina como al control (shcontrol, 0nM) al cual se le asignó el valor de 1.

1.4. Estudio de nuevas aproximaciones terapéuticas utilizando el modelo humanizado de AF: Terapia Génica.

El conjunto de resultados mostrados en el apartado 1.3 sugiere que el ratón humanizado generado mediante el trasplante de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ transducidos con VL:sh7FANCA podría ser un modelo adecuado para estudiar distintas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento del problema hematológico de la AF. Una de las terapias en las cuales está involucrado nuestro laboratorio se basa en la terapia génica con vectores lentivirales portadores del gen FANCA para complementar el defecto genético y solucionar el problema a nivel hematológico en los pacientes. La validez de este vector ya ha sido demostrada *in vitro* [6], pero nuestro modelo permitiría demostrar la eficacia y seguridad de este vector en PHs humanos que expresan el fenotipo de AF *in vivo*.

1.4.1. Generación y eficacia del vector terapéutico PGK.FANCA.Wpre* con mutaciones silentes en FANCA.

Para estudiar la eficacia del protocolo de terapia génica en primer lugar se han de generar células madre hematopoyéticas interferidas para el gen FANCA. Posteriormente estas células se transducirán con el vector terapéutico (VL:PGK.FANCA.Wpre*) y se evaluará su eficacia para poder reconstituir la hematopoyesis de un ratón inmunodeficiente. Sin embargo, la utilización de este vector nos plantea el problema de que ningún shARN dirigido contra la región 3'UTR del gen FANCA inhibió de forma eficaz la expresión de este gen, por lo que se optó por el shARN que tenía como diana una región de la secuencia del ADN codificante de dicho gen y que resultó ser más eficaz. Esto hace que el ARN interferente tenga como dianas tanto el ADNc del gen endógeno como el del gen FANCA ectópico introducido en la célula a través del vector terapéutico.

Para solventar este problema, diseñamos un nuevo vector con mutaciones silentes o sinónimas generadas en el gen FANCA presente en el vector PGK.FANCA.Wpre*. Con ello se modificó la secuencia nucleotídica del gen para impedir el reconocimiento de ésta por parte del shARN, evitando la modificación de la secuencia de aminoácidos de la proteína FANCA y que ésta fuera funcional y estructuralmente igual a la original (Ver materiales y métodos, apartado 5). Esta aproximación permitió estudiar la corrección realizada por este vector en células en las que el gen hFANCA estaba interferido. Así pues, se generaron dos vectores a partir del vector PGK.FANCA.Wpre* con 2 ó 3 bases mutadas en la secuencia del gen FANCA reconocida por el sh7FANCA (PGK.FANCA.Wpre* 2 mut y PGK.FANCA.Wpre* 3 mut respectivamente)

Una vez generados estos vectores, el siguiente paso fue comprobar su capacidad de corregir células AF-A. Para ello se transdujo una línea de células linfoblastoides humanas (LCLs) de un paciente de AF-A (AF-A 88) con los dos vectores. Como control positivo se transdujo la misma línea celular con el vector clínico PGK.FANCA.Wpre* original y validado previamente, utilizando como control negativo la línea del paciente sin transducir. En presencia de diferentes concentraciones de MMC se pudo comprobar que la utilización de cualquiera de estos dos vectores revertía la sensibilidad a MMC de la línea original, a niveles similares a los alcanzados cuando se utiliza el vector terapéutico PGK.FANCA.Wpre* (Fig. 45).

Puesto que los dos vectores generados mostraron resultados similares de resistencia a MMC, se eligió aquél en el que se habían realizado tres mutaciones para minimizar el riesgo de reconocimiento del vector por parte del interferente sh7FANCA. A partir de este momento el vector aparecerá en el texto como PGK.FANCA^{mut silente} y el vector PGK.FANCA.Wpre* original como PGK.FANCA clínico.

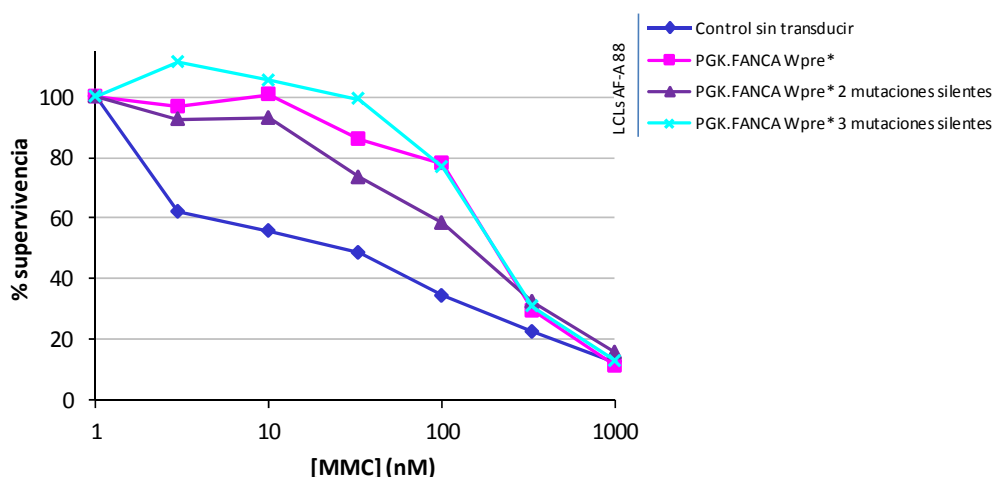


Figura 45. Sensibilidad a MMC en la línea linfoblástide AF-A 88 corregida con el vector terapéutico y dos versiones con mutaciones silentes de dicho vector. Existe una reversión de la sensibilidad a MMC en las tres líneas transducidas con las diferentes versiones del vector PGK.FANCA.Wpre* en comparación con las células sin transducir.

1.4.2. Terapia génica *in vitro* de células CD34⁺ interferidas en FANCA.

En estos experimentos comprobamos *in vitro* la posibilidad de revertir la sensibilidad a MMC de progenitores hematopoyéticos interferidos en FANCA. Para ello, re-transdujimos las células CD34⁺ previamente interferidas con el sh7FANCA con tres vectores diferentes: el vector VL:IN (vector que no contiene el transgén FANCA y se utilizará como control negativo), el vector PGK.FANCA clínico y el vector PGK.FANCA^{mut silente} respectivamente. Como controles adicionales se utilizaron células CD34⁺ transducidas previamente con los dos vectores control (VL:shcontrol y VL:IN). Las células se cultivaron en presencia y ausencia de MMC, con el objetivo de estudiar la sensibilidad a MMC de los PHs correspondientes a diferentes condiciones. El resultado de tres experimentos independientes mostró que la reversión de la sensibilidad a MMC de PHs interferidos corregidos mediante terapia génica, tanto cuando se utilizaba el vector PGK.FANCA clínico como cuando se usaba el vector PGK.FANCA^{mut silente}, ya que la supervivencia de las UFCs alcanzaba valores similares al mostrado por células control (CD34⁺+VL:shcontrol+VL:IN). Por otra parte, la supervivencia fue significativamente superior a la presentada por células interferidas no corregidas mediante terapia génica (Fig. 46).

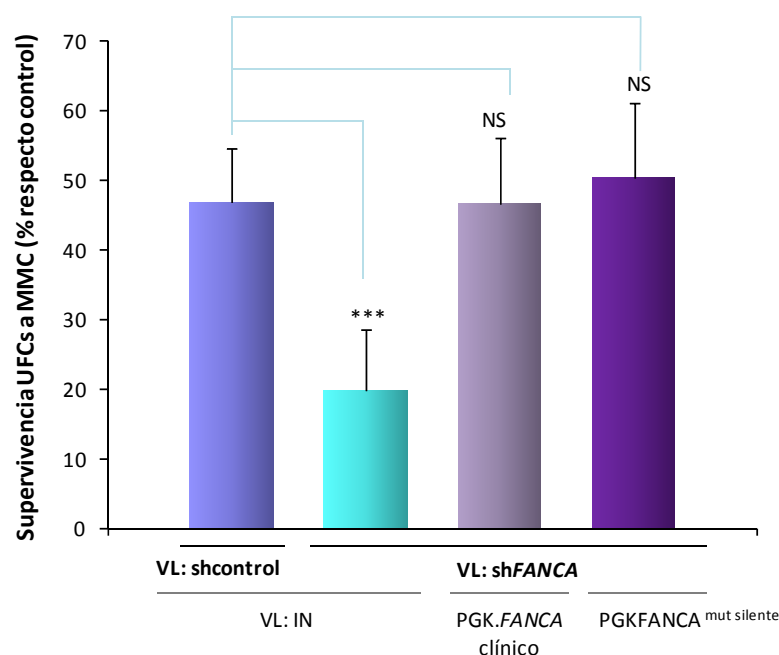


Figura 46. Reversión de la sensibilidad a MMC en PHs interferidos en *FANCA* y corregidos por terapia génica con vectores VL:PGK.*FANCA* (VL:PGK.*FANCA*clínico y VL:PGK.*FANCA*^{mut silente}). Se compararon los tres grupos de CD34⁺+VL:sh7*FANCA* con las células CD34⁺+VL:shcontrol. Las células interferidas sin corregir mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$, test de U de Mann-Whitney) con las células sin interferir. Sin embargo, cuando estas células se corrigieron por terapia génica con cualquiera de los dos vectores no se observaron diferencias significativas (NS) con las células sin interferir ($p > 0,05$, test U Mann-Whitney). Las barras de error corresponden al error típico de la media ($n=3$).

1.4.3. Eficacia de la Terapia Génica para revertir el fenotipo de células interferidas en *FANCA* en el modelo de ratón humanizado.

Por último, nos planteamos comprobar la eficacia de la terapia génica trasplantando ratones inmunodeficientes NSG (NOD/Shi-*scid*/IL-2Rγ^{null}) con los diferentes grupos experimentales mostrados en el apartado anterior con el objeto de estudiar el comportamiento de estas células *in vivo* y validar la eficacia de la terapia génica a largo plazo, mimetizando así el protocolo a llevar a cabo en pacientes AF.

Inicialmente se realizó un primer experimento en el que los ratones NSG se trasplantaron con células transducidas sin seleccionar (1×10^6 células al 40% de transducción), lo que nos permitió, como en los experimentos previos, estudiar el comportamiento de las células interferidas frente a las células sanas. Para ello, se trasplantaron ratones NSG con los siguientes grupos de células, transducidas con el vector interferente a un nivel del 40% (% de células eGFP⁺):

1. CD34⁺+shcontrol: Re-transducidas con VL:PGK.IN.
2. CD34⁺+sh7*FANCA*: Re-transducidas con VL:PGK.IN.
3. CD34⁺+sh7*FANCA*: Re-transducidas con VL:PGK.*FANCA* clínico.
4. CD34⁺+sh7*FANCA*: Re-transducidas con VL:PGK.*FANCA*^{mut silente}.

En estos ratones se evaluó la capacidad de injerto de las células interferidas sin corregir o corregidas con el VL:PGK.*FANCA* clínico o bien mediante el VL:PGK.*FANCA*^{mut silente}. Se observó que, a lo largo del tiempo post-trasplante (30, 60, 90 y 120 días post-trasplante), existía un incremento de la capacidad de injerto de las células eGFP⁺-CD45⁺ en aquellos grupos en los que tras la interferencia del gen *FANCA* se había realizado la transducción con alguno de los vectores terapéuticos. Esta tendencia

positiva se observó también en las células control ($CD34^+$ +*shcontrol*+ VL:PGK.IN). Sin embargo, en los ratones en los cuales se habían trasplantado células interferidas sin corregir ($CD34^+$ + *sh7FANCA*+ VL:PGK.IN) la tendencia de las células injertadas era decreciente a lo largo del tiempo (Fig. 47).

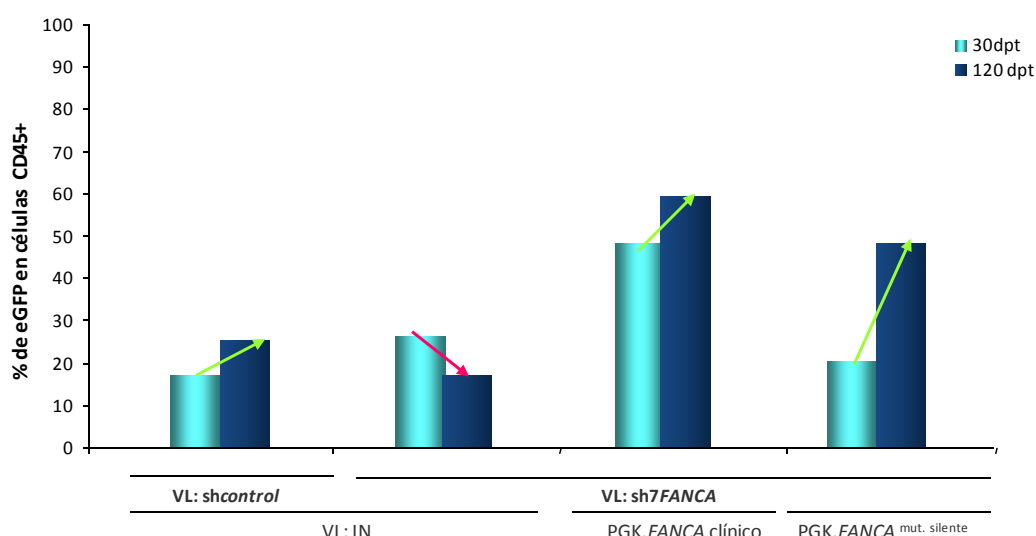


Figura 47. Capacidad de injerto de células $CD34^+$ interferidas y no seleccionadas antes y después de su corrección con vectores PGK.FANCA clínico y PGK.FANCA mut silentes. Se observa un incremento (flecha verde) del porcentaje de células $eGFP^+/CD45^+$ en los grupos celulares corregidos mediante terapia génica, similar a lo que ocurre en las células control, mientras que esta tendencia es negativa cuando las células están sin corregir.

En un segundo experimento, se seleccionaron las células interferidas $eGFP^+$ mediante citometría de flujo para tener una población celular homogénea que expresase el *shFANCA*, y estas células fueron posteriormente transducidas con los vectores terapéuticos.

En este caso los ratones se trasplantaron con tres grupos diferentes de células sorteadas (5×10^5 células):

1. $CD34^+$ +*shcontrol* $eGFP^+$: Re-transducidas con VL:PGK.IN
2. $CD34^+$ + *sh7FANCA* $eGFP^+$: Re-transducidas con VL:PGK.IN
3. $CD34^+$ +*sh7FANCA* $eGFP^+$: Re-transducidas con VL:PGK.FANCA clínico.

Se observó que, mientras que las células interferidas tendían a disminuir a lo largo del tiempo tras el trasplante, las células corregidas con el vector clínico mantuvieron el nivel de injerto a lo largo de todo el experimento (Fig. 48). Cabe reseñar que puesto que no existe competición con células sanas, el efecto observado debido a la interferencia es menor, ya que la presencia de células sin defecto en la ruta de AF tienen ventaja proliferativa frente a las células interferidas, lo cual favorece la desaparición de las células interferidas a lo largo del tiempo.

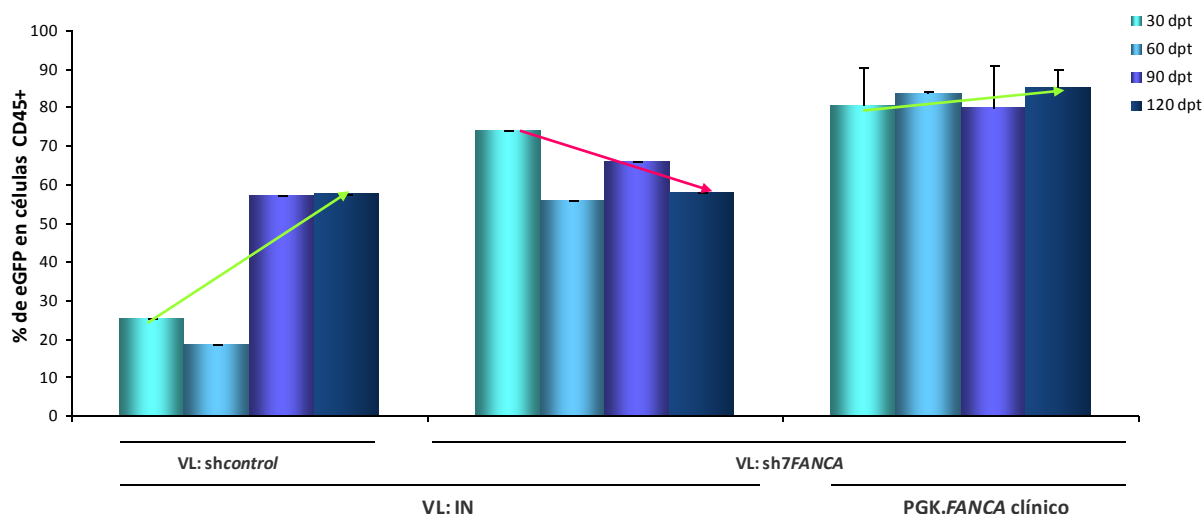


Figura 48. Capacidad de injerto de células $CD34^+$ interferidas en *FANCA* y seleccionadas antes y después de su corrección con el vector clínico VL:PGK.*FANCA*. Se observa que el porcentaje de células $eGFP^+/CD45^+$ en el grupo celular corregido mediante terapia génica se mantiene estable, mientras que tiende a disminuir cuando las células están sin corregir.

■ Reversión de la sensibilidad a MMC de Progenitores hematopoyéticos con fenotipo AF corregidos mediante terapia génica a largo plazo después del trasplante.

Tras el estudio de la evolución del injerto en los ratones NSG de las células interferidas corregidas y sin corregir por terapia génica, se evaluó si la corrección revertía la sensibilidad a MMC de las células interferidas. Para ello, se obtuvieron células de MO de ratones a 120 días post-trasplante, se crecieron en metilcelulosa que contenía factores de crecimiento de PHs humanos y se expusieron a una dosis de MMC de 30 nM. En la figura 49 se puede observar que los PHs interferidos en *FANCA* que posteriormente fueron corregidos con el vector PGK.*FANCA*^{mut silente} mostraron una mayor supervivencia en comparación a PHs interferidos no corregidos por terapia génica. Este nivel de supervivencia de las células corregidas fue comparable al mostrado por el grupo control ($CD34^+$ +shcontrol+ VL:PGK.IN) (Fig. 49), demostrando la reversión del fenotipo a largo plazo en PHs humanos con fenotipo de AF corregidos mediante terapia génica.

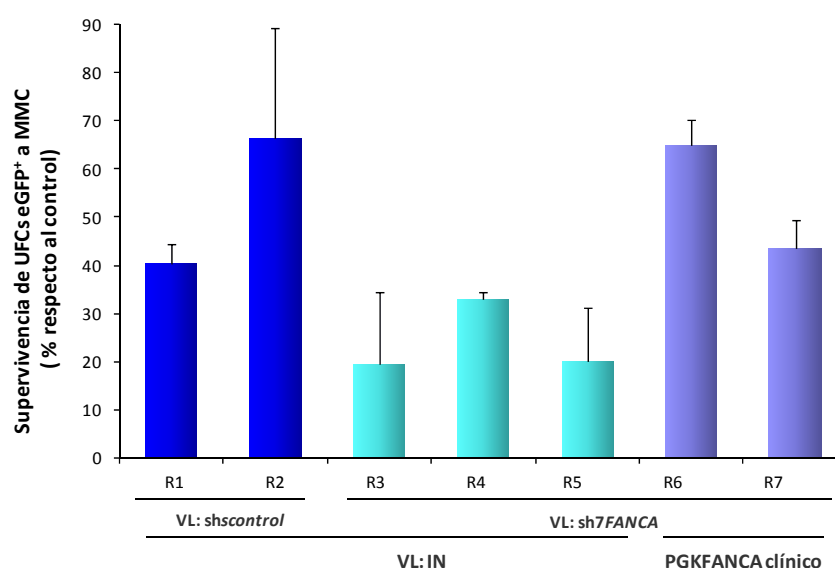


Figura 49. Reversión de la sensibilidad a MMC de los PHs humanos con fenotipo AF corregidos por terapia génica. Cada barra representa el porcentaje de supervivencia de UFCs de células obtenidas de la MO de ratones NSG previamente trasplantados (R1-R7) en presencia de 30 nM de MMC respecto a las Colonias en ausencia de MMC.

2. GENERACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DERIVADOS DE iPSCs A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON ANEMIA DE FANCONI-A CORREGIDOS MEDIANTE TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA EN UN SITIO SEGURO.

El segundo de los objetivos planteados en esta tesis doctoral fue la generación de progenitores hematopoyéticos derivados de iPSCs a partir de fibroblastos de pacientes corregidos mediante terapia génica dirigida al locus *AAVS1*, un sitio seguro del genoma.

La tecnología de las iPSC que se ha desarrollado durante los últimos años ha permitido crear expectativas acerca de su utilización futura en la terapia de algunas enfermedades. En nuestro caso la combinación de esta tecnología con la terapia génica dirigida nos ha permitido generar progenitores hematopoyéticos a partir de fibroblastos de pacientes corregidos por edición génica.

La estrategia seguida consistió en la obtención de células diferenciadas de pacientes de AF-A, en concreto fibroblastos de piel, que fueron corregidos *in vitro* mediante una estrategia de edición génica que consistió en la introducción de una única copia del gen *FANCA* en el locus *AAVS1*, ya que este sitio fue descrito como un lugar seguro en el genoma humano [7]. Una vez corregidos, los fibroblastos se reprogramaron utilizando el vector STEMCCA [10] que posee los cuatro genes de reprogramación descritos por Yamanaka [9] para así generar células pluripotentes inducidas (iPSC). Tras la escisión del casete de reprogramación utilizando un vector que codificaba la Recombinasa Cre, los clones de iPSCs corregidos se diferenciaron a células hematopoyéticas corregidas (Fig. 50).

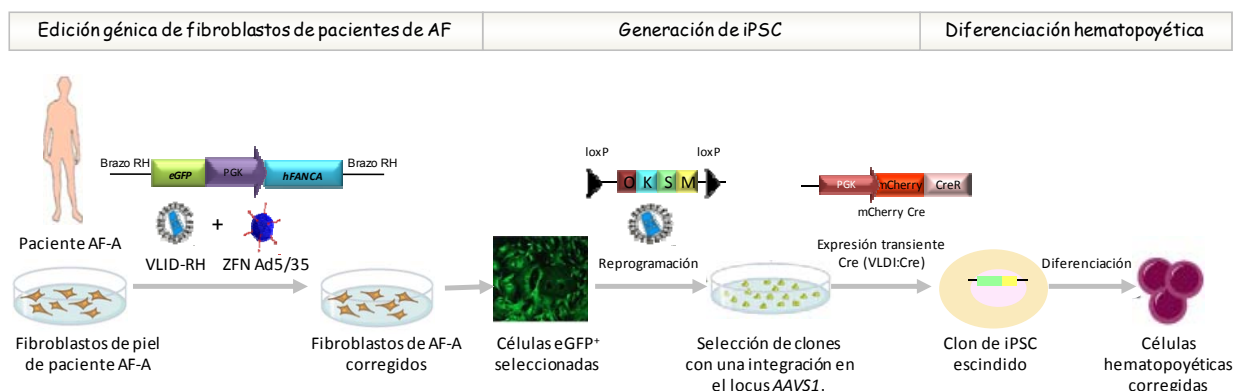


Figura 50. Esquema del protocolo de generación de células hematopoyéticas a partir iPSCs procedentes de fibroblastos de pacientes de AF-A corregidos por edición génica. Los fibroblastos de pacientes de AF-A fueron corregidos mediante recombinación homóloga en el sitio seguro *AAVS1*, se seleccionó la población eGFP⁺ coincidente con los fibroblastos corregidos y se reprogramaron para generar iPSCs. A continuación se escindió el vector de reprogramación y se llevó a cabo un protocolo de diferenciación para generar células hematopoyéticas corregidas.

2.1. Análisis de la eficacia de la recombinación homóloga en células de Anemia de Fanconi.

La corrección por terapia génica dirigida del fenotipo de enfermedades monogénicas ha mejorado significativamente desde que se desarrollaron las nucleasas de diseño capaces de generar dobles roturas en regiones específicas del ADN, pues con ello se aumentó considerablemente la eficacia de recombinación homóloga. Sin embargo, en el caso de la AF surgía la pregunta de si sería posible llevar a cabo estas estrategias de edición génica mediante RH pues se trata de un síndrome de reparación del ADN donde no está clara la relevancia de la ruta de AF en RH [537, 538].

Así pues, en esta parte del trabajo analizamos en primer lugar si era posible la integración por RH de un casete de expresión en el *locus AAVS1* de células AF-A y si la eficiencia de esta inserción se veía disminuida en células de AF frente a sus homólogas corregidas.

■ Establecimiento de las condiciones óptimas de co-transducción de LCLs de AF con AdV-ZFNs y el vector donador VLDI-PGK.eGFP.

Para facilitar la RH del gen *eGFP* en el sitio *AAVS1* en células de AF se co-transdujeron células de pacientes de AF con ZFN específicos del sitio *AAVS1* y con el vector donador y se estudió la expresión de *eGFP*.

Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron LCLs de pacientes de AF-A, un vector adenoviral de tipo quimérico 5/35 que porta la pareja heterodimérica de nucleasas dedos de zinc (AdV-ZFNs) específica para el sitio *AAVS1* desarrollado por Sangamo y col. [7, 289, 373] y un vector lentiviral no integrativo que actúa como donador y que contiene el gen *eGFP* que se expresará bajo la acción del promotor PGK (fosfoglicerato quinasa) y los brazos de homología para el gen *PPP1R12C* situado en el *locus AAVS1*. Estos brazos de homología facilitarán la integración del casete de expresión en el sitio deseado, el intrón 1 del gen mencionado (Fig. 51)



Figura 51. Esquema del vector donador VLDI PGK.eGFP. Las LCLs de pacientes de AF-A, sus homólogas corregidas o LCLs de donantes sanos se transdujeron tanto con AdV5/35-ZFN como con el VLDI-donador que expresa la proteína marcadora *eGFP* bajo el promotor PGK y que contiene los dos brazos de homología para el *locus AAVS1*.

En primer lugar se evaluó cuál era la dosis más adecuada del vector AdV-ZFNs para lograr una integración eficiente del casete de expresión en el sitio *AAVS1*. Para ello se co-transdujo una línea de LCLs del paciente de AF-A 88 con 150 ng p24/μl del vector donador (dosis previamente establecida como óptima en el trabajo de Lombardo y col. [279]) y con diferentes MOIs del AdV-ZFNs que comprendían desde 32,5 a 2.000 virus/ml. Adicionalmente se incluyó una condición en la que sólo se realizaba la transducción con el vector donador; de este modo pudimos estimar mediante la expresión de *eGFP*, el porcentaje de integración no específica. Finalmente, también se incluyó una última condición en la que las células no se transdujeron con ningún vector. Al cabo de 14 días estudiamos el porcentaje de células *eGFP*⁺, ya que esas células serían las que habían integrado en su genoma el vector donador. La elección de este periodo de tiempo se debió a que se ha estimado que es en este periodo de tiempo cuando no hay expresión episomal de los vectores, es decir, cuando se considera que toda la expresión observada del transgén es debida únicamente a aquélla que procede del vector integrado, ya que la expresión transitoria ha desaparecido.

Se observó que el porcentaje más alto de células *eGFP*⁺ se obtuvo con una MOI=1000 virus/ml del vector AdV-ZFNs (Fig. 52). En ningún caso se observó toxicidad debido a la expresión de los ZFNs. Además, comparando el porcentaje de células *eGFP*⁺ obtenido cuando las células fueron co-transducidas con AdV-ZFNs y el vector donador frente al porcentaje obtenido cuando las células se

habían transducido con el vector donador, se pudo observar que la práctica totalidad de la expresión de eGFP era debida a la integración del vector donador facilitada por la acción de las ZFNs.

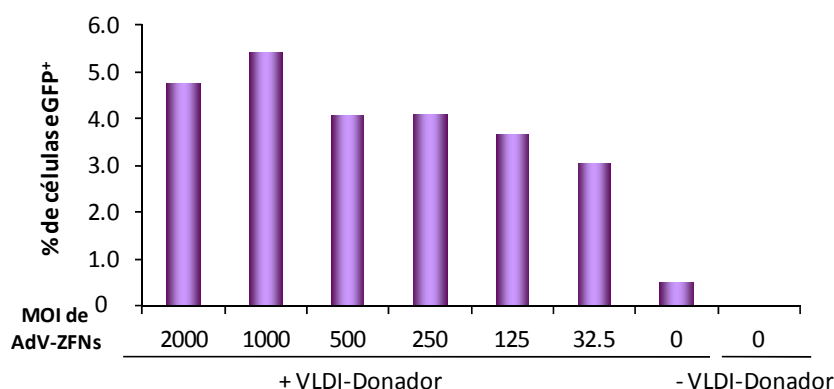


Figura 52. Porcentaje de células eGFP⁺ en una línea de LCLs de un paciente AF-A (AF-A 88) utilizando diferentes MOIs del Adv-ZFNs. Las LCLs del paciente AF-A se transdujeron con diferentes MOI del vector Adv-ZFNs (32,5-2000) y con el VLDI-donador (150 ng-p24/ μ l).

■ Estudio de la eficiencia de Recombinación Homóloga en LCLs de pacientes de AF-A.

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas de transducción de las células AF-A, se llevaron a cabo experimentos con el objetivo de estudiar la posibilidad de realizar terapia génica dirigida mediante RH en células de AF. Con este fin se transdujeron tres líneas de LCLs obtenidas de tres pacientes AF-A (AF-A 8, AF-A 56 y AF-A 88) con Adv-ZFN (MOI=1000) y VLDI:PGK.eGFP como vector donador control (150 ng-p24/ μ l).

Para evaluar el efecto que tenía la deficiencia del gen *FANCA* sobre la eficiencia de RH, se realizaron en paralelo idénticos estudios sobre células AF-A sin corregir y o corregidas previamente con el vector terapéutico PGK.*FANCA*.Wpre*. Al igual que en el experimento anterior, al cabo de 14 días se analizó el porcentaje de eGFP por citometría de flujo en estas líneas celulares (Fig. 53), tiempo en el cual la expresión transitoria del vector no integrado había desaparecido.

El porcentaje de células eGFP⁺ en las LCLs de AF-A sin complementar varió entre 0,16-0,87% cuando se co-transdujeron con los ZFN y con el vector donador. Sin embargo, cuando las células fueron transducidas únicamente con el vector donador (VLDI:PGK.eGFP), el porcentaje de células eGFP⁺ fue en la mayoría de los casos significativamente inferior, sugiriendo la integración por RH al utilizar el vector donador y los ZFN (Adv-ZFN+ VLDI:PGK.eGFP), dato ya vislumbrado también en la figura 52.

La comparación de la eficacia de RH en las líneas de LCLs de pacientes de AF-A con sus homólogas complementadas para el gen *FANCA* nos mostró que, aunque existían leves diferencias en el nivel de expresión de eGFP entre la células corregidas frente a las no corregidas, éstas parecían ser dependientes de la línea celular utilizada y lo que es más relevante para la consecución de nuestros objetivos, demostramos que, incluso en las células deficientes en el gen *FANCA*, se pueden llevar a cabo protocolos de edición génica por RH utilizando ZFNs, lo que confirma la utilidad de nuestra aproximación.

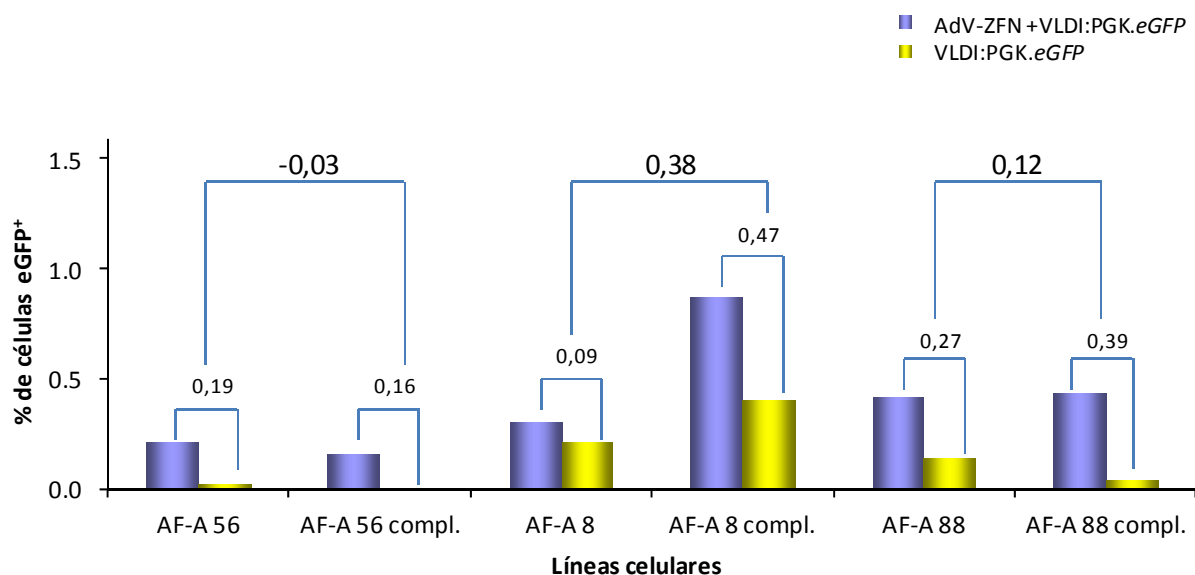
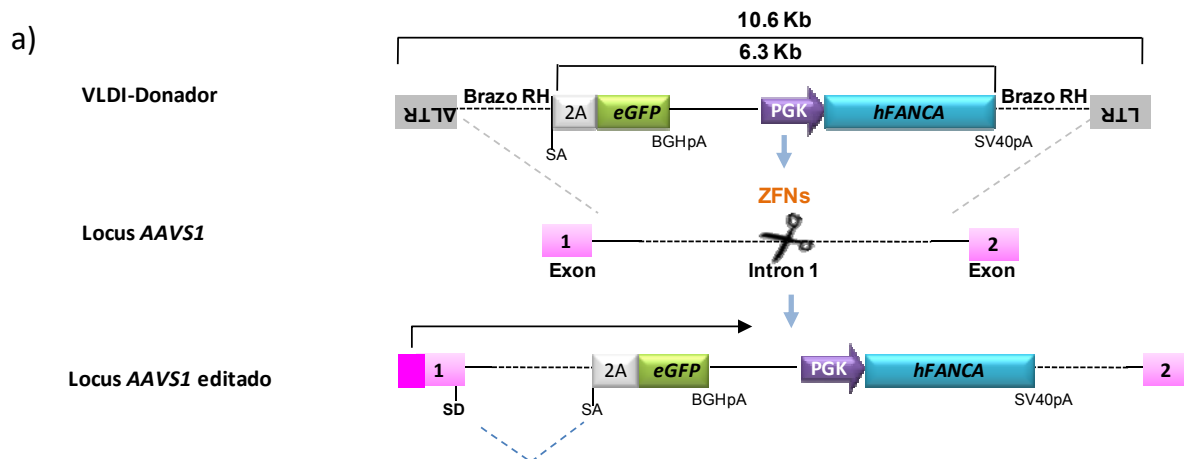


Figura 53. Análisis de la expresión de eGFP en diferentes líneas linfoblastoides AF-A. Las LCLs de pacientes de AF-A y sus homólogas corregidas fueron transducidas tanto con AdV-ZFN (MOI=1000) como con el VLDI-donador PGK.eGFP (150 ng-p24/ μ l) para estimar la eficiencia de la RH. Los valores mostrados indican la diferencia de porcentaje de células eGFP⁺ entre las células transducidas con el vector AdV-ZFN+Donador o sólo con el donador, y también la diferencia de porcentaje entre las células de pacientes AF-A corregidas respecto a las sin corregir.

2.2. Terapia génica dirigida en fibroblastos de pacientes de AF-A.

Una vez que se comprobó que era posible realizar protocolos de edición génica mediante RH utilizando ZFNs en células procedentes de pacientes con AF-A, se desarrolló un vector donador que contenía el gen humano *FANCA* bajo el promotor PGK y el gen marcador *eGFP* precedido por la secuencia 2A. Este casete de expresión está flanqueado por dos brazos con secuencias de homología para el gen *PPP1R12C* que favorecen su integración en el intrón 1 de dicho gen. Una vez que el vector se inserta en el sitio deseado tras la acción de la pareja de ZFNs que corta específicamente en el locus *AAVS1*, la expresión de *eGFP* estará conducida por el promotor del gen *PPP1R12C*, gracias a la introducción de un sitio aceptor delante del gen *eGFP* que permitirá un correcto corte y empalme del ARNm (*splicing*) (Fig. 54a).

La utilización de este vector en combinación con el AdV-ZFN permitía corregir los fibroblastos de pacientes con AF-A en un sitio seguro del genoma, como es el *AAVS1* (Fig. 54b).



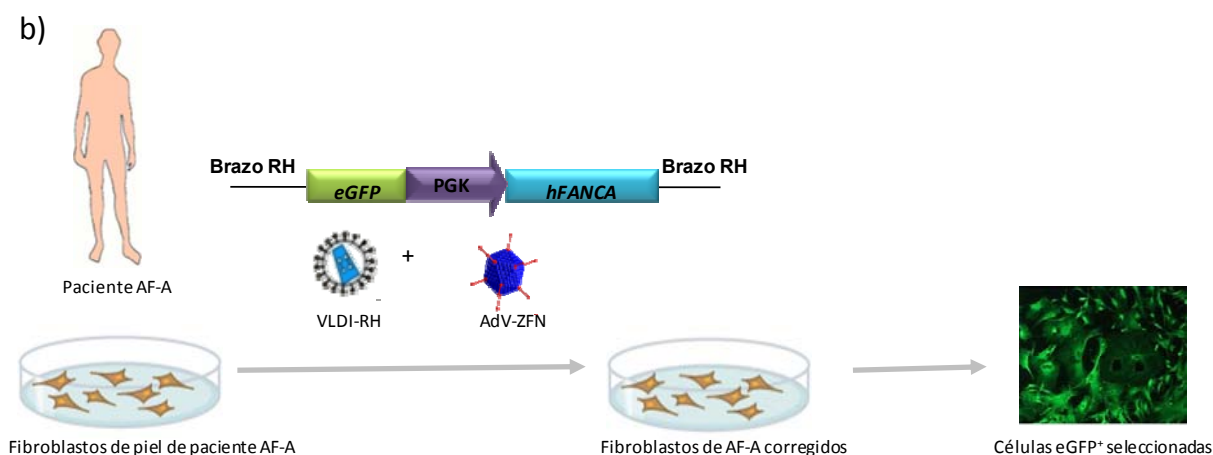


Figura 54. Estrategia de RH utilizada en fibroblastos AF-A. a) Esquema del vector donador pCCL.2A. *eGFP*.PGK.*FANCA* y su integración en el intrón 1 del locus *AAVS1* mediada por ZFNs específicos. b) Esquema de la realización de corrección mediante terapia génica dirigida en fibroblastos derivados de pacientes de AF-A utilizando el vector lentiviral no integrativo pCCL.2A.*eGFP*.PGK.*FANCA* (VLDI:RH-*FANCA*) y el vector AdV-ZFN. PGK: Promotor fosfoglicerato quinasa 1, *eGFP*: proteína verde fluorescente, *hFANCA*: ADNc del gen humano *FANCA*, LTR: Región larga terminal, SA: Aceptor de *splicing*. SD: Donador de *splicing*.BGHpA: Señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, SV40pA: Señal de poliadenilación del virus de simio 40.

2.2.1. Determinación de la MOI del vector de donador de RH (VLDI: RH-*FANCA*) en células de AF-A.

Tras la construcción del vector, se evaluó su capacidad para corregir la línea de LCLs del paciente AF-A 88 por RH mediada por nucleasas.

En primer lugar se estudió cual era la dosis óptima del vector donador que había que utilizar, puesto que la cantidad de donador utilizada en los experimentos previos había sido definida por el grupo del Dr. Naldini para un vector de un tamaño mucho menor (pCCL.PGK.*eGFP*). Para ello se transdujo la línea linfoblastoide AF-A 88 con el vector AdV-ZFN con una MOI=1000 fija y con tres dosis diferentes de vector donador: 450 ng-p24/μl, 300 ng-p24/μl y 150 ng-p24/μl, y se analizó por citometría de flujo la expresión de eGFP tras 14 días de transducción. Así se comprobó que la dosis más adecuada del vector donador es la de 150 ng/μl (Fig. 55a). Hay que resaltar que este vector tiene la particularidad de que la eGFP sólo se expresa cuando se introduce en el intrón 1 del gen *PPP1R12C*, ya que su expresión estará dirigida por el promotor de dicho gen tras la señal adecuada de corte y empalme. Esto tiene el inconveniente de que la IMF observada es mucho menor cuando se utiliza este vector que cuando se usa el vector de RH-*eGFP* (pCCL.PGK.*eGFP*) (Fig. 55b), pero la gran ventaja es que seleccionando la población eGFP⁺ nos aseguramos que la mayoría de las células eGFP⁺ tendrán el casete de expresión introducido en el sitio deseado.

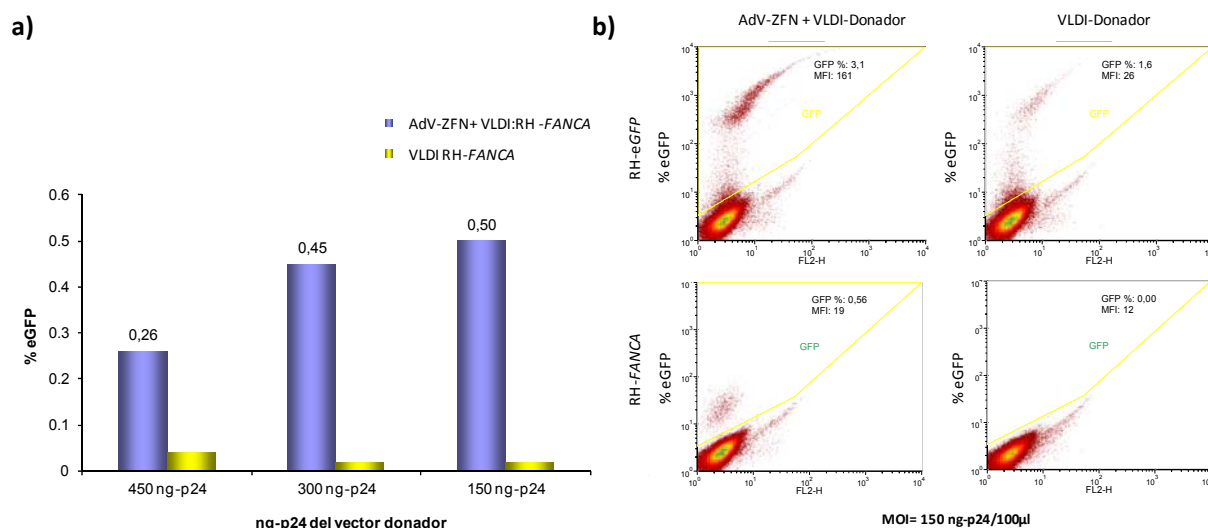


Figura 55. a) Optimización de la MOI del vector donador para los experimentos de corrección mediada por RH. La línea linfobláste de AF-A 88 se transdujo con 3 MOIs diferentes del vector donador VLDI RH-FANCA (pCCL2A.eGFP.hFANCA), comprobando que la MOI de 150 ng-p24/μl era la más adecuada en combinación con una MOI fija de AdV-ZFN (MOI=1000). **b) Comparación del nivel de expresión de eGFP en la línea de LCLs AF-A 88 dependiendo del vector donador utilizado.** Las LCLs AF-A88 fueron transducidas tanto con el vector donador de RH-eGFP (pCCL.PGK.eGFP), como con el RH-FANCA (pCCL.2A.eGFP.PGK.hFANCA) en combinación con los AdV-ZFN, como sólo con el donador correspondiente.

2.2.2. Corrección de fibroblastos de AF-A mediante edición génica.

■ Co-transducción con el VLDI:RH-FANCA y el AdV-ZFNs en fibroblastos de AF-A.

Al igual que se realizó en el caso de las LCLs, el primer paso fue determinar la MOI de AdV-ZFN necesaria para la transducción de los fibroblastos con la máxima eficiencia y la mínima toxicidad para las células. La transducción de una línea de fibroblastos de un paciente de AF-A (AF-153) con diferentes MOIs del AdV-ZFN (MOI=800-100) y una MOI fija del vector donador (VLDI:RH-FANCA, MOI= 150ng-p24/μl), demostró que el porcentaje más alto de células eGFP⁺ se alcanzaba con la MOI=200 de AdV-ZFN (Fig. 56).

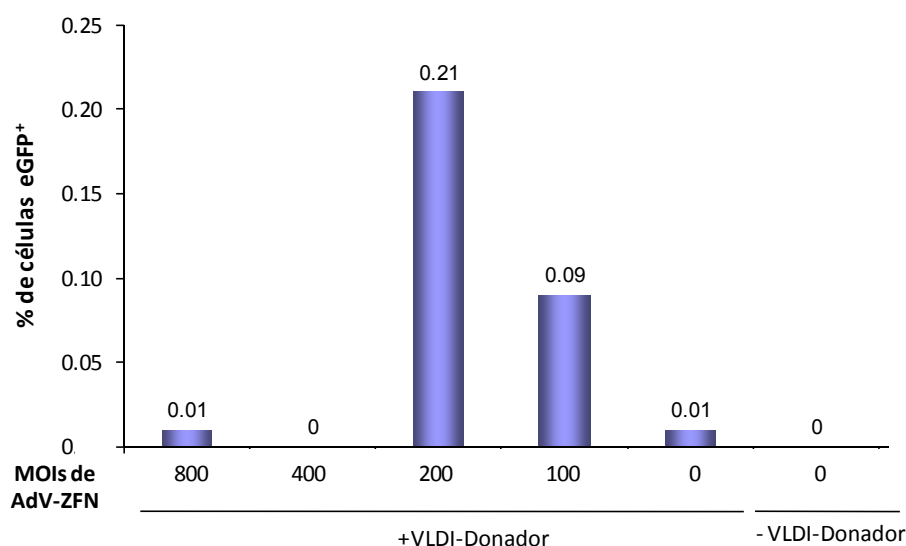


Figura 56. Estudio del porcentaje de células eGFP⁺ en fibroblastos de un paciente AF-A (AF-A 153) utilizando diferentes MOIs de AdV-ZFN y una MOI fija del vector donador (VLDI:RH-FANCA). Los fibroblastos AF-A 153 se transdujeron con el vector donador pCCL2A.eGFP.PGK.FANCA (150 ng-p24/ μl) y con diferentes MOIs del vector AdV-ZFN (800-100 virus/célula).

Una vez establecidas las MOIs adecuadas para realizar los experimentos de edición génica, se co-transdujeron fibroblastos primarios de cuatro pacientes de AF-A diferentes, tanto con el vector donador VLDI:RH-FANCA (pCCL.2A.eGFP.PGK.FANCA) (MOI=150 ng-p24/μl), como con los AdV-ZFNs (MOI=200 virus/célula) o sólo con el vector donador, y se analizó la expresión de eGFP a los 14 días tras la transducción. En aquellas células que fueron transducidas únicamente con el vector donador no se observó expresión de eGFP, mientras que las células transducidas también con los AdV-ZFN presentaron niveles de expresión entre el 0,2-1,10%.

Como se puede observar en la figura 57 el porcentaje de células eGFP⁺ aumentó notablemente a lo largo del tiempo alcanzando valores de expresión que oscilaban entre 5,50 y 13,40 % tras 42 días de cultivo *in vitro*, lo que sugiere que las células del paciente se han corregido y por ello presentaban ventaja proliferativa frente a aquéllas que no lo están.

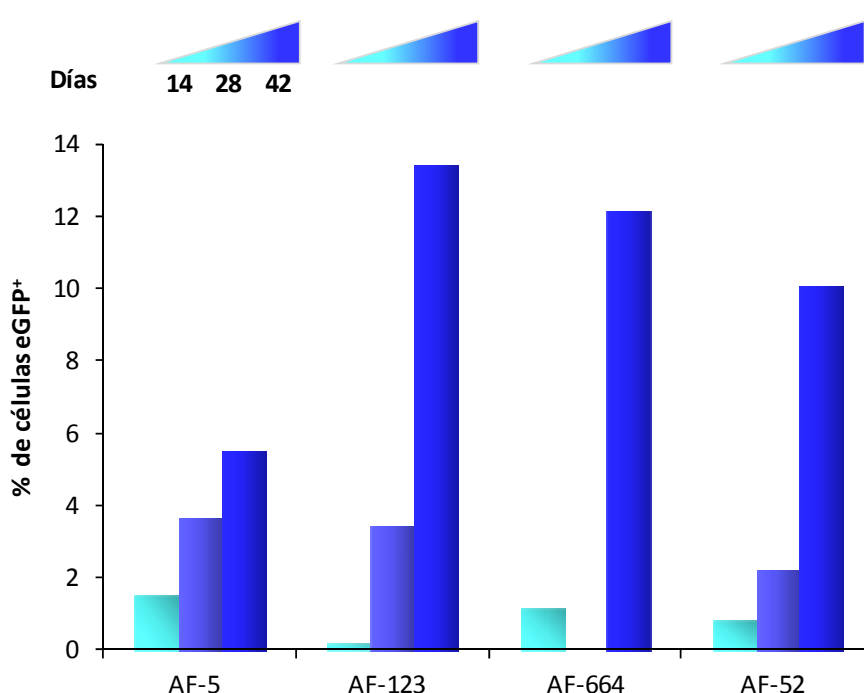


Figura 57. Análisis del porcentaje de células eGFP⁺ en fibroblastos AF-A transducidos con el vector donador VLDI:RH-FANCA (MOI=150 ng-p24/μl) y el vector AdV-ZFN (MOI=200). La eficiencia de RH fue medida como expresión de eGFP en fibroblastos de cuatro pacientes diferentes. Se puede observar la ventaja proliferativa de los fibroblastos editados genéticamente a lo largo del tiempo de cultivo *in vitro* (análisis a 14, 28 y 42 días después de la transducción).

■ Inmortalización de fibroblastos de AF-A mediante la transducción con VL:hTERT.

Puesto que la manipulación para realizar la integración del gen *FANCA* en el sitio seguro AAVS1 requiere el mantenimiento en cultivo de las células de los pacientes durante largos períodos de tiempo y teniendo en cuenta que las células de AF tienen una senescencia incrementada [539], se decidió transducir fibroblastos de tres pacientes de AF-A (AF-52, AF-123 y AF-664) con un vector lentiviral integrativo que contenía un casete que codifica la subunidad hTERT de la telomerasa humana y la HSV1-TK (del inglés *Herpes Simplex Virus Type I Thymidine Kinase*), y que contiene un sitio loxP en la región U3 de la LTR3' (Fig. 58). Tras la transcripción reversa la región U3 de la LTR 3', que contiene el sitio LoxP, se duplica, de modo que las secuencias LoxP que flanquean el genoma del provirus integrado permiten su posterior escisión con la proteína CreRecombinasa. El gen TK permite,

además, la selección negativa de las células que no hayan escindido el provirus tras el tratamiento con ganciclovir [505].



Figura 58. Esquema del vector utilizado para la inmortalización de los fibroblastos de AF-A. El vector codifica para la subunidad hTERT de la telomerasa y la proteína timidín quinasa (TK) como proteína de selección. Además posee un sitio loxP en la región 3'LTR.

Una vez transducidas las células de los pacientes de AF-A con el vector VL:hTERT para limitar su senescencia, se comparó la eficiencia de RH en presencia/ausencia de telomerasa en tres pacientes distintos, todos ellos del grupo de complementación A. Se pudo observar un incremento de diez veces en el porcentaje de células eGFP⁺ cuando éstas estaban transducidas con el vector que expresaba la telomerasa, respecto al porcentaje mostrado en células sin transducir con el VL:hTERT, alcanzando valores que oscilaron entre 0,6 y el 4,5% (Fig 59a). Es decir, la expresión de la telomerasa aumentó la eficiencia de RH en las células de tres pacientes diferentes, probablemente debido al incremento de la proliferación mostrada por esas células.

Al igual que ocurría en el caso de los fibroblastos de pacientes no transducidos con telomerasa, la corrección por edición génica confirió a los fibroblastos inmortalizados con hTERT una ventaja proliferativa, de modo que tras 42 días en cultivo se alcanzó un porcentaje de células eGFP⁺, en el paciente AF-52 del 40% (Fig. 59b).

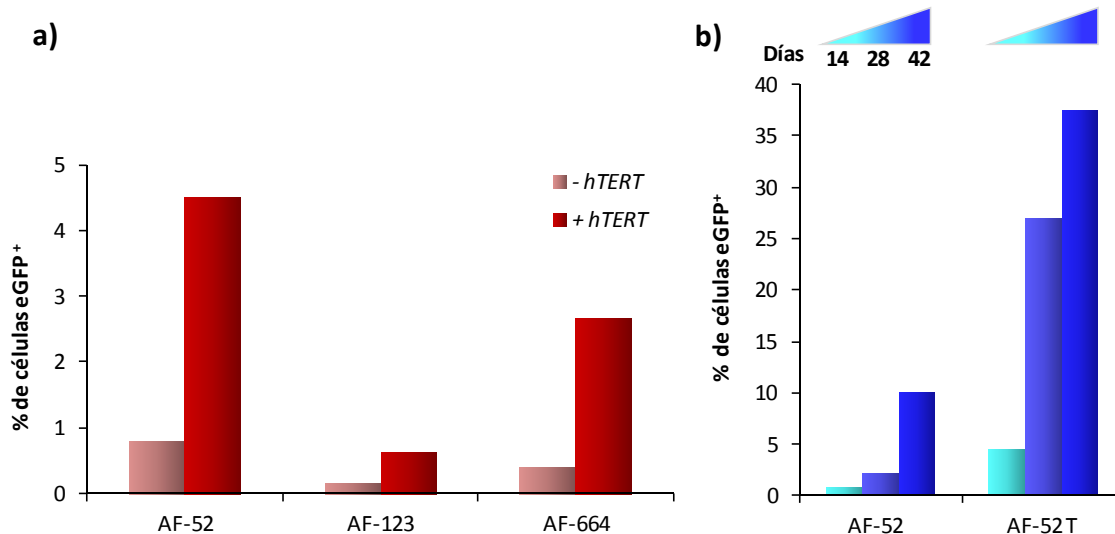


Figura 59. Eficiencia de RH en células de AF-A antes y después de su inmortalización con VL:hTERT. a) Comparación de la eficacia de la RHD en fibroblastos de tres pacientes de AF-A antes (datos previamente mostrados en la fig.57) y después de ser transducidos con el VL:hTERT. b) Estudio de la ventaja proliferativa de los fibroblastos AF-A tras su corrección por terapia génica dirigida, tanto antes (datos previamente mostrados en la fig.57) como después de su inmortalización con VL:hTERT.

■ Análisis de la integración del casete de RH en el sitio AAVS1.

Para los posteriores estudios elegimos los fibroblastos de AF-52T y seleccionamos la población de células eGFP⁺ utilizando un separador celular. A continuación, se comprobó por PCR la integración del casete del vector donador que contiene el gen hFANCA en el sitio seguro AAVS1 del genoma humano. Para ello se realizaron PCRs con dos parejas de cebadores distintos, una para el

extremo 5' y otra para el extremo 3', que amplificaban la zona de unión entre el casete de expresión y el gen endógeno en el que se había insertado (Fig. 60a). Estas PCRs confirmaron la correcta integración del casete de RH (2A.eGFP.PGK.hFANCA) en el intrón 1 del gen *PPP1R12C* por recombinación homóloga (Fig. 60b).

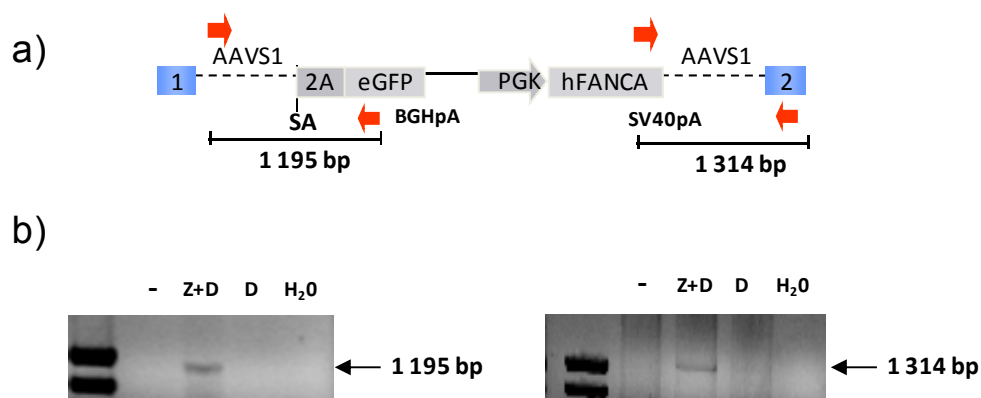


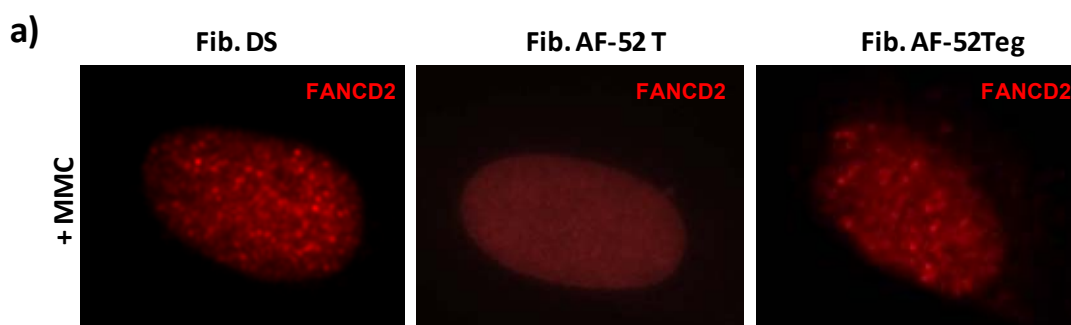
Figura 60. Análisis por PCR de la integración del casete de RH en el sitio seguro AAVS1. a) Esquema de la hibridación de los cebadores en el ADN y los fragmentos que se amplifican. **b)** Amplificación por PCR de las regiones correspondientes a la unión entre el locus AAVS1 y el casete del VL:RH-FANCA tanto en el extremo 5' (gel izquierda) como en el 3' en los fibroblastos AF-52Teg (gel derecha).

2.2.3. Estudio de la corrección fenotípica de fibroblastos de pacientes de AF-A mediante edición génica.

Una vez que se comprobó la correcta inserción de hFANCA en el locus AAVS1 se evaluó la funcionalidad de la proteína expresada a partir de este gen. Con este propósito se llevaron a cabo dos pruebas funcionales para verificar el correcto funcionamiento de la ruta de AF.

■ Estudio de los focos nucleares de FANCD2 en fibroblastos editados genéticamente.

En primer lugar se evaluó la presencia de focos nucleares en los fibroblastos editados genéticamente (eg) en presencia de MMC. Recordemos que para que ocurra la monoubiquitinización y movilización de la proteína FANCD2 a los sitios de reparación en el ADN es necesario que todas las proteínas del complejo “core” de la ruta de AF, entre las que se incluye FANCA, sean funcionales. Tanto en presencia como en ausencia de MMC se observó la aparición de focos nucleares en los fibroblastos AF-52Teg, al contrario de lo que ocurría con las mismas células sin transducir, alcanzando valores muy similares a los observados en las células control (Fig. 61 a y b)



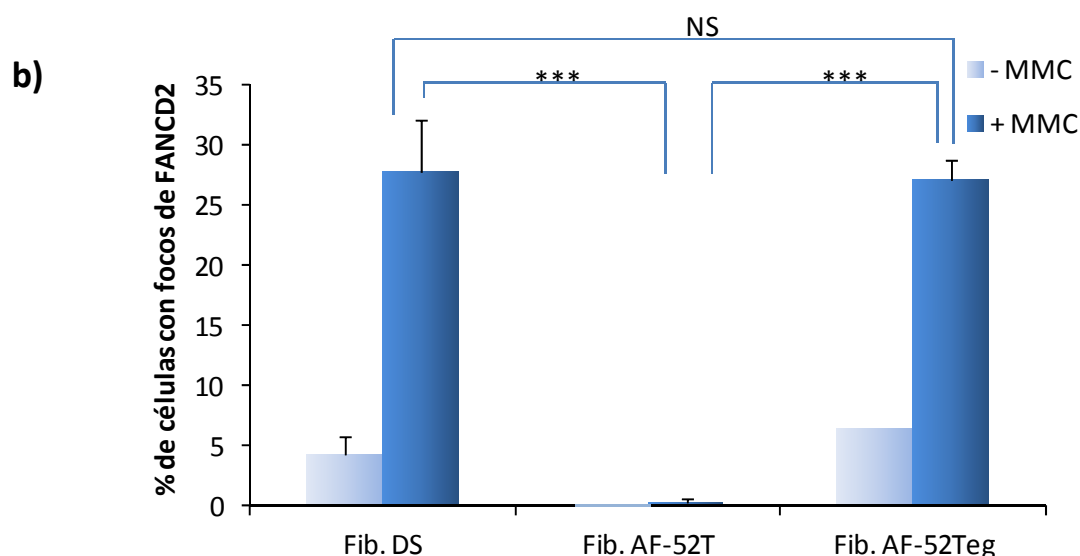


Figura 61. Corrección fenotípica de fibroblastos AF-A sometidos a terapia génica por edición génica. a) Inmunofluorescencia representativa de FANCD2 en fibroblastos de un donante sano (DS), un paciente AF- 52T o los fibroblastos de dicho paciente corregidos mediante edición génica (eg).b) Cuantificación del porcentaje de células con focos de FANCD2 en fibroblastos de un donante sano (DS), en fibroblastos AF-52T y en fibroblastos AF-52Teg en presencia y ausencia de MMC, contabilizado en 3 experimentos independientes (n=3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. NS: No significativo. Las barras de error representan el error típico de la media.

■ Estudio de la estabilidad cromosómica.

Otra de las características distintivas de las células de pacientes con AF-A es el incremento de la inestabilidad cromosómica cuando estas células son expuestas a agentes entrecruzantes del ADN tales como el diepoxibutano (DEB). El tratamiento con DEB durante 48 horas indujo la aparición de un alto número de aberraciones cromosómicas en los fibroblastos AF-52T, entre las que se incluyeron algunas de las típicamente observadas en células de pacientes AF como son roturas cromosómicas y cromosomas radiales [82, 540]. Sin embargo, tras la corrección de estos fibroblastos mediante terapia génica dirigida, el número de aberraciones disminuyó hasta niveles de una célula sana (Fig. 62 a y b).

El conjunto de estos resultados junto con la aparición de focos nucleares de FANCD2 mostró por primera vez, que es posible corregir el fenotipo de células de pacientes de AF mediante estrategias de edición génica, en concreto mediante la introducción específica del gen *hFANCA* en un locus seguro del genoma humano, el locus *AAVS1*.

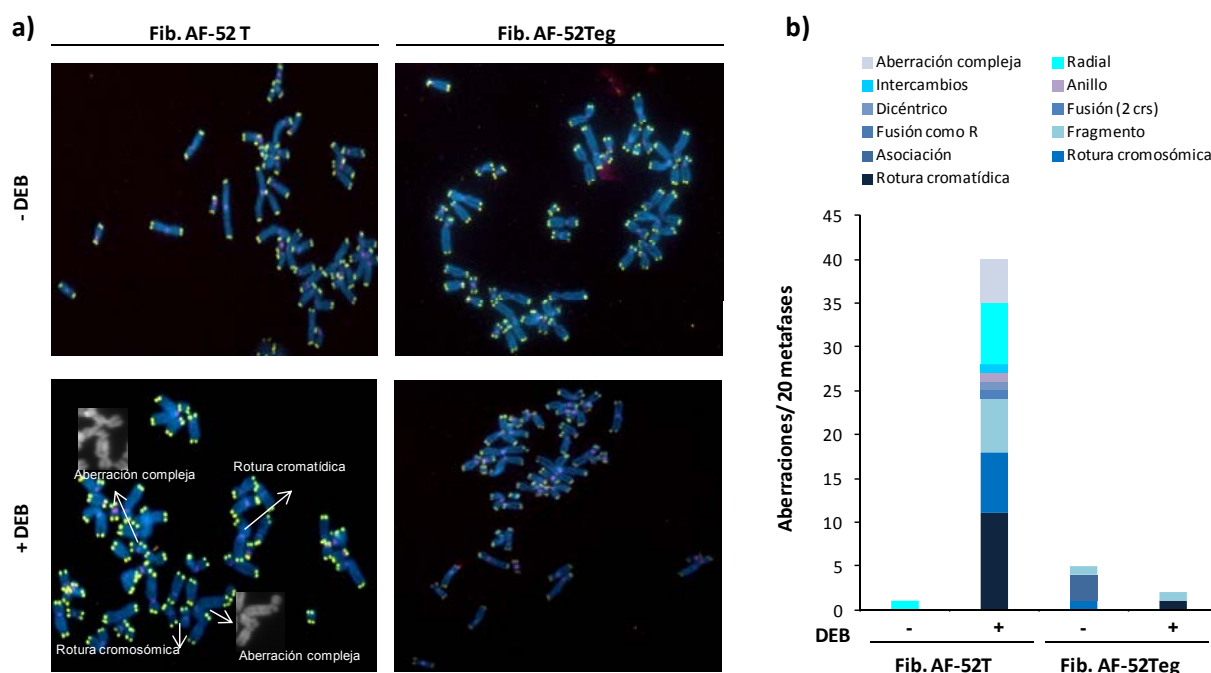


Figura 62. Estudio de la inestabilidad cromosómica inducida por DEB en fibroblastos AF-52T corregidos por edición génica. a) Microfotografías representativas del análisis de FISH en el que se utilizaron sondas para detectar los telómeros (verde) y los centrómeros (rosa). Todas las muestras presentan un cariotipo normal 46 XY. **b)** Cuantificación de las aberraciones cromosómicas en presencia y ausencia de DEB en fibroblastos de AF-A corregidos y sin corregir. Se observa que la elevada inestabilidad cromosómica se ha corregido en los fibroblastos AF-52Teg.

2.3. Generación de iPSCs a partir de fibroblastos de AF-A corregidos mediante edición génica.

Una vez que se verificó la corrección mediante edición génica de fibroblastos AF-A, se llevó a cabo la reprogramación de éstos con un vector de reprogramación policistrónico escindible (STEMCCA) para generar células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Los diferentes clones de iPSCs se caracterizaron y por último, se escindieron los genes de reprogramación para obtener iPSCs más seguras (Fig. 63).

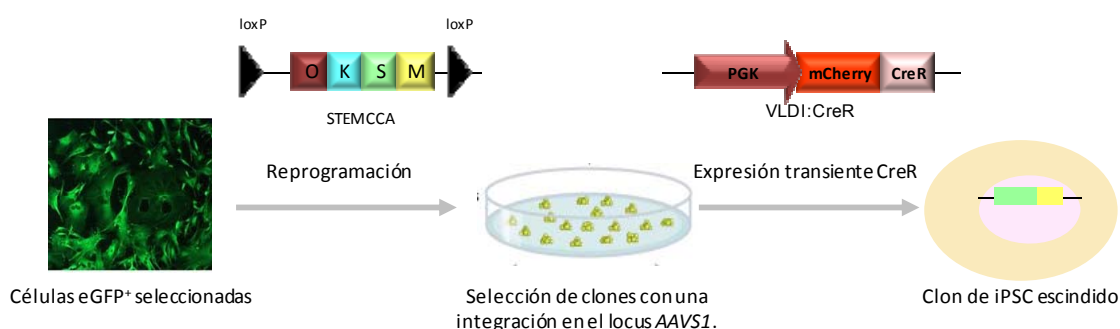


Figura 63. Diagrama representativo del protocolo utilizado para la generación de iPSCs a partir de fibroblastos AF-A corregidos por edición génica. Los fibroblastos AF-Aeg seleccionados mediante un separador celular se reprogramaron con el vector lentiviral STEMCCA. Se seleccionaron tres clones que presentaban una copia del casete de RH integrado en el locus AAVS1. Posteriormente se escindieron los genes de reprogramación con el vector VLDI:mCherry.2A.Cre.

2.3.1. Eficiencia de generación de iPSCs a partir de fibroblastos AF-A en presencia o ausencia de hTERT.

Una vez que los fibroblastos de AF-A se corrigieron mediante edición génica se reprogramaron estas células para generar iPSCs. Con este objetivo los fibroblastos primarios de

diferentes pacientes corregidos por edición génica se transdujeron con el vector STEMCCA, un vector lentiviral escindible que contenía los cuatro factores de reprogramación descritos por Yamanaka, *Sox2*, *Oct3/4*, *Klf4* y *cMyc* [516] a MOI=1 virus/ml. Además, estudiamos si la transducción de estos fibroblastos con el vector que expresaba la subunidad TERT de la telomerasa contribuía a mejorar la reprogramación. Para ello, fibroblastos corregidos transducidos o no con el vector VL:hTERT se retransdujeron con el vector STEMCCA:

- 2.1. Fibroblastos sin telomerasa: Fibroblastos AF-52eg y AF-123eg enriquecidos en la población eGFP⁺ mediante un separador celular.
- 2.2. Fibroblastos con telomerasa: Fibroblastos AF-52eg que, además, tras la corrección mediante edición génica fueron transducidos con este vector (VL:hTERT) para limitar la senescencia que tiene lugar tras el largo período de manipulación de las células en cultivo *in vitro* (expansión, edición génica, selección con separador celular, reprogramación)[541]. Se denominarán como AF-52Teg.

Se plaquearon 10.000 fibroblastos de cada condición. Tras 13 días en cultivo, se observaron las primeras colonias con morfología de células madre embrionarias (CME) y positivas a la tinción con fosfatasa alcalina (AP⁺), procedentes de los fibroblastos AF-123eg y AF-52Teg, mientras que no se apreció la generación de ninguna colonia en los fibroblastos AF-52 eg sin inmortalizar con hTERT. Este último dato, junto a la desaparición progresiva de los clones de los fibroblastos AF-123eg tras cinco pases en cultivo, subraya la importancia de la hTERT para incrementar la eficiencia de la reprogramación celular de fibroblastos AF-A editados genéticamente (Fig. 64).

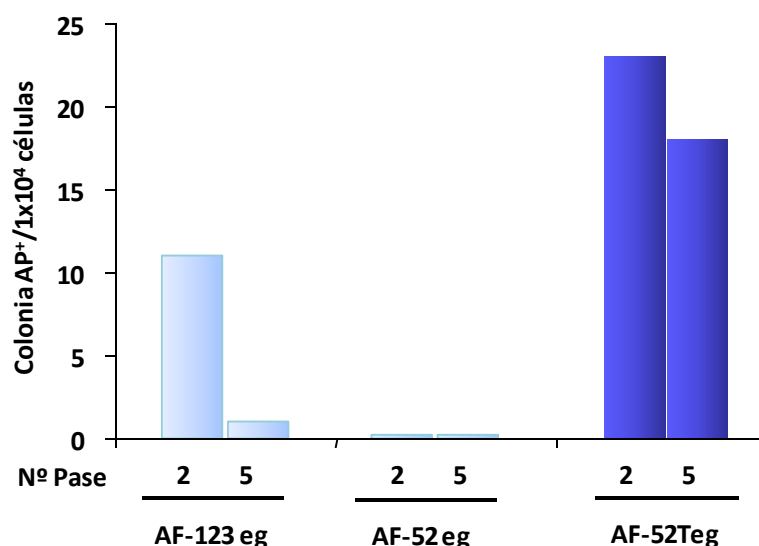


Figura 64. Eficiencia de reprogramación en fibroblastos AF-Aeg inmortalizados o no con hTERT. La eficiencia de reprogramación se cuantificó como número de colonias AP⁺ (fosfatasa alcalina positivas) generadas a partir de 1x10⁴ fibroblastos transducidos con VL:STEMCCA a 2 y 5 pases tras la transducción. Las barras azul claro representan los fibroblastos primarios sin inmortalizar y las azul oscuro las inmortalizadas con VL:hTERT.

La siguiente duda que surgió es si células de AF no corregidas e inmortalizadas con hTERT podrían generar colonias de iPSCs, de modo que no fuera necesaria la corrección de la mutación antes de la reprogramación.

Para ello se realizó un experimento para verificar la relevancia de la corrección de la mutación causante de AF en las células antes de llevar a cabo la reprogramación celular. Esto ya había

sido reportado en publicaciones anteriores [136, 542], pero no se había estudiado en presencia de TERT. Así pues, fibroblastos del paciente AF-123 antes y después de su corrección mediante editado génico se transdujeron con el vector de reprogramación (Fig. 65). Como puede observarse en la figura 65a la corrección de células AF-123 (AF-123eg) incrementa notablemente el número de colonias AP⁺ a niveles similares a los observados en las fibroblastos de donantes sanos, en contraste con las que se generan a partir de los fibroblastos AF-123 sin corregir. Por otro lado y para confirmar que la presencia de hTERT no era capaz, por sí sola, de mejorar la reprogramación en células que no están corregidas se analizó la capacidad de generar colonias AP⁺ de fibroblastos del paciente AF-123 sin corregir y transducidos o no con el VL:hTERT. En la figura 65b se puede observar que únicamente la presencia de hTERT, en ausencia de la complementación del gen AF-A mutado, no es suficiente para que la reprogramación permita la desdiferenciación a células iPSCs, como sí ocurre a partir de células de donantes sanos. Es decir, la inmortalización con hTERT *per se* no mejora la eficacia de reprogramación en fibroblastos AF-A no corregidos.

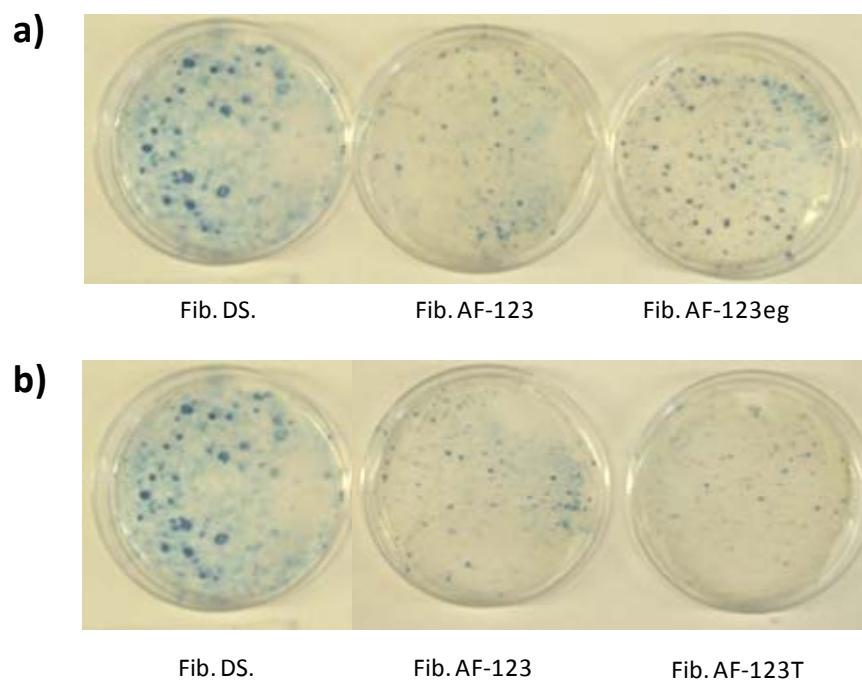


Figura 65. Eficiencia de reprogramación en fibroblastos de AF mediante tinción con AP (fosfatasa alcalina). a) Eficiencia de reprogramación en fibroblastos AF-123 corregidos y sin corregir por edición génica. Se observa que hay un mayor número de colonias AP⁺ en las células corregidas que en aquellas que no lo están. b) La eficiencia de reprogramación en AF-123 sin corregir antes y después de su inmortalización con hTERT es mucho menor que en el caso de un DS.

2.3.2. Análisis de iPSCs-eg generadas a partir de fibroblastos AF-52Teg.

A partir de los fibroblastos AF-52Teg se obtuvieron 60 clones de iPSCs de los cuales se eligieron 12 de ellos para su posterior estudio. Para llevar a cabo los estudios de inserción en los clones de iPSC generados y seleccionados, éstos se expandieron y se diferenciaron a fibroblastos para así obtener una cantidad suficiente de ADN para su posterior análisis.

En primer lugar se evaluó el número de copias del vector de RH que existía en cada clon con objeto de seleccionar aquellos que únicamente portaron un reducido número de copias del transgén. Para ello se realizó una qPCR con cebadores diseñados para detectar el gen *eGFP* (Fig. 66a). Como se

observa en la tabla 15, 11 de los 12 clones seleccionados de iPSCs contenían más de 0,4 copias/célula, valor que fue establecido como umbral para determinar la existencia de 1 copia eGFP/célula [510]. Además en ninguno de ellos se alcanzó el valor de 2 copias/célula. Es importante destacar que el clon 5, en el cual no se detectaron copias de la secuencia de RH, sólo pudo mantenerse durante 6 pases en cultivo. Esto confirma resultados previos, que indican la relevancia de la proteína FANCA para que se lleve a cabo la generación de iPSCs mediante la reprogramación celular [136].

En segundo lugar, como criterio para seleccionar los clones de iPSCs más adecuados, se evaluó por qPCR el número de copias del vector STEMCCA de reprogramación. Para ello se utilizaron cebadores que hibridaban con la secuencia Wpre, presente únicamente en este vector (Figura 66b). Se puede apreciar que el número de copias de este vector varía entre 1 y 2 en todas las colonias, lo cual favorecerá su posterior escisión (Tabla 15).

Por último, y para verificar que el vector de RH detectado por qPCR se encontraba única y específicamente integrado en el sitio diana del genoma donde habían cortado los ZFN, se realizó una PCR convencional, igual a la descrita en el apartado 2.2.2 de esta sección, para detectar las uniones entre el casete de expresión y el locus AAVS1 tanto en el extremo 3' como en el 5' (Fig. 66c). Los resultados obtenidos muestran que en todos los clones en los que se detectó una copia del vector de RH por qPCR se observó también banda de amplificación cuando se utilizaron los cebadores para la integración específica en el extremo 5' y que 10 de los 11 clones también eran positivos para la integración en el extremo 3' del locus AAVS1. Estos resultados confirman que todos los clones de iPSCs que fueron positivos para la presencia del vector de RH mediante detección del gen *eGFP* por qPCR presentaban también el casete de expresión insertado en el locus AAVS1. Además, puesto que no se había detectado más de una copia/célula de este vector, esto sugería que en ninguno de los clones existían inserciones de copias al azar en sitios que no fueran la diana de integración (Tabla 15).

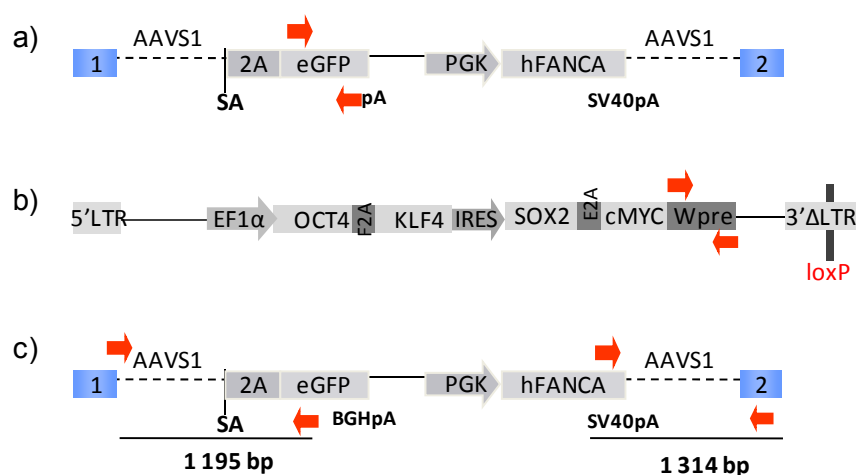


Figura 66. Esquema de los diferentes cebadores utilizados para el análisis molecular de las iPSCs-AFeg. a) Detección del número de copias del vector de RH mediante la amplificación del gen eGFP. b) Análisis del número de copias del vector de reprogramación STEMCCA mediante la amplificación de un fragmento de la secuencia Wpre. c) Detección de la inserción específica del casete de RH en el locus AAVS1 mediante la utilización de dos parejas de cebadores que hibridan cada una en un extremo de la unión casete de RH-locus AAVS1.

Tipo celular	Nombre del clon	Casete RH (dLV-NC)	N° copias STEMCCA	AAVS1 PCR	
				Región 5'	Región 3'
F-iPSCs-AFeg	1	0,74	0,90	+	+
	5	0,06	0,61	-	-
	11	0,38	1,33	+	+
	12	1,09	1,02	+	+
	14	0,84	1,13	+	+
	16	0,64	0,78	+	+
	17	0,41	1,45	+	+
	23	1,10	1,26	+	+
	26	1,31	0,87	+	+
	31	0,96	0,75	+	+
	33	1,77	1,99	+	+
	41	1,54	1,07	-	+
Fibroblastos	AF-52T	0,01	0,08	-	-

Tabla 15. Análisis molecular de fibroblastos derivados de 12 clones diferentes de iPSCs-AFeg. F-iPSC eg: Fibroblastos derivados de iPSCs eg. El n° de copias del vector STEMCCA y del vector de RH está relativizado al gen constitutivo GAPDH y al clon HT4 con una copia conocida de un vector lentiviral. La integración del casete de expresión de RH fue confirmada por PCR de la región de unión entre casete de RH-locus AAVS1 en extremos 3' y 5'.

Para confirmar los resultados de PCR y qPCR se seleccionaron tres de los once clones de iPSCs, siguiendo criterios morfológicos y moleculares, y en ellos se analizó la integración del vector de RH por Southern Blot (SB). La digestión del ADN genómico de las diferentes iPSCs con BstXI y su hibridación con una sonda específica del gen *eGFP*, dentro del casete de expresión, confirmó la existencia de una única copia del vector de RH en el genoma de los 3 clones iPSCs y que ninguno de los clones presentaba integraciones fuera del sitio AAVS1 (Fig. 67a). Por otro lado, la digestión con BglII y la utilización de una sonda que hibridaba en el locus AAVS1 en una región adyacente a la inserción del vector en el extremo 3' dio lugar a la aparición de dos bandas: una de mayor tamaño (5,3 Kb) que verifica, una vez más, la inserción del casete en el sitio seguro AAVS1 en los tres clones, y otra de menor tamaño (3,5 Kb) correspondiente al locus AAVS1 sin inserción y que aparece tanto en los clones como en el control negativo (Fig. 67b).

El conjunto de estos datos confirman la integración en heterocigosis del casete de RH en el sitio seguro AAVS1 en todos los clones seleccionados y la ausencia de integración en otros locus del genoma.

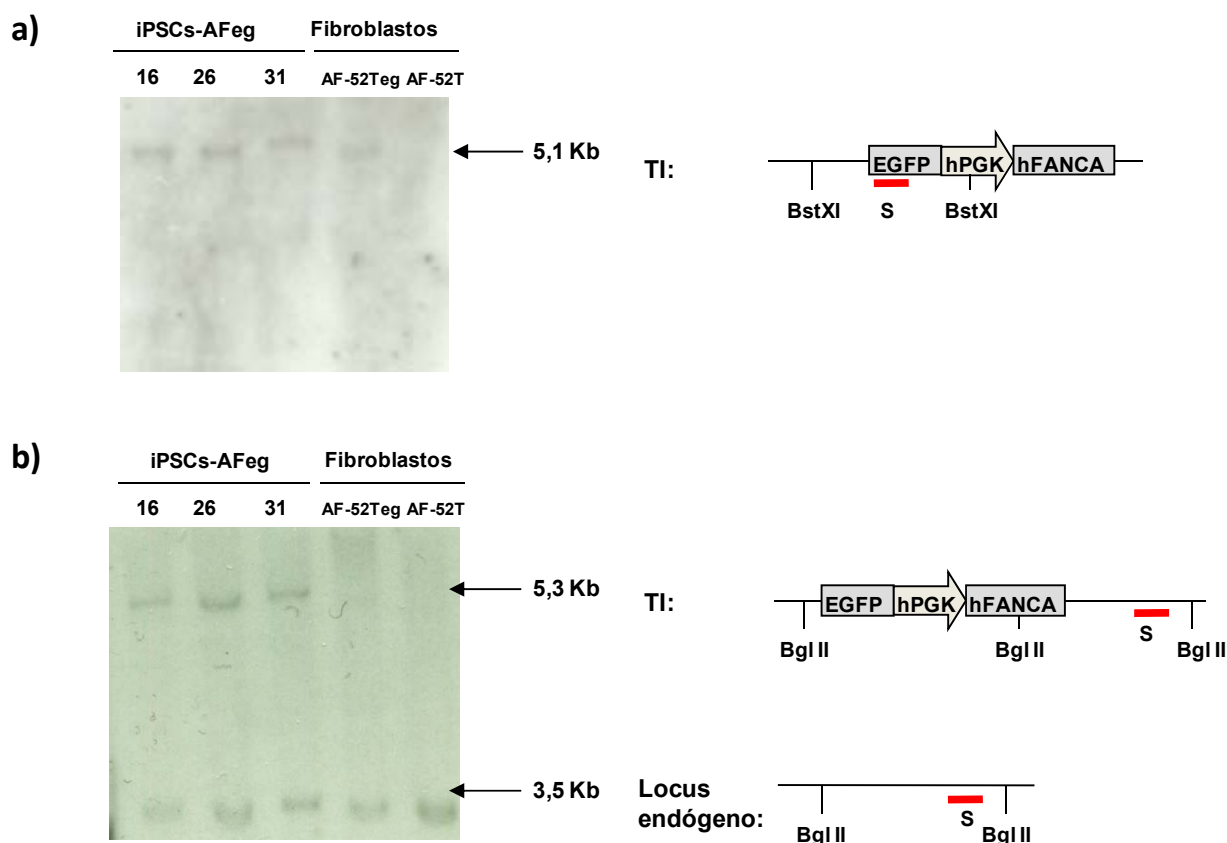


Figura 67. Análisis por Southern Blot del ADN genómico de fibroblastos primarios de AF-52T, fibroblastos AF-52T eg y en tres clones de iPSCs derivados de ellos. a) La utilización de una sonda (S) eGFP para hibridar el ADN digerido con BstXI muestra una banda de 5,1 Kb cuando la inserción del casete ha ocurrido en el sitio AAVS1. **b)** La utilización de una sonda que hibrida con una secuencia de la región 3' en el locus AAVS1 muestra una banda de 5,3 Kb cuando la inserción ocurre en el sitio AAVS1 y otra de 3,5 Kb correspondiente al alelo de AAVS1 en el que no se ha insertado el casete de RH. La digestión del ADN se realizó con BglII.

2.4. Estudio de la pluripotencia de las iPSCs-AFeg generadas a partir de fibroblastos de AF-A editados genéticamente.

2.4.1. Detección por inmunohistoquímica de marcadores de pluripotencia.

Los clones de iPSCs que fueron seleccionados se sometieron a diferentes análisis para confirmar su pluripotencia:

- Tinción para la detección de la actividad fosfatasa alcalina (AP) ya que las células madre tienen elevada actividad de esta enzima en su membrana [543, 544].
- Marcajes inmunohistoquímicos para detectar la expresión de marcadores de pluripotencia: OCT3/4, NANOG, TRA-1-60 y SSEA-4 [9, 544].

En la figura 68 se corrobora que todos los clones son positivos a la expresión de estos marcadores: AP, OCT3/4, NANOG y TRA-1-60, SSEA-4, lo cual confirmó su naturaleza pluripotente.

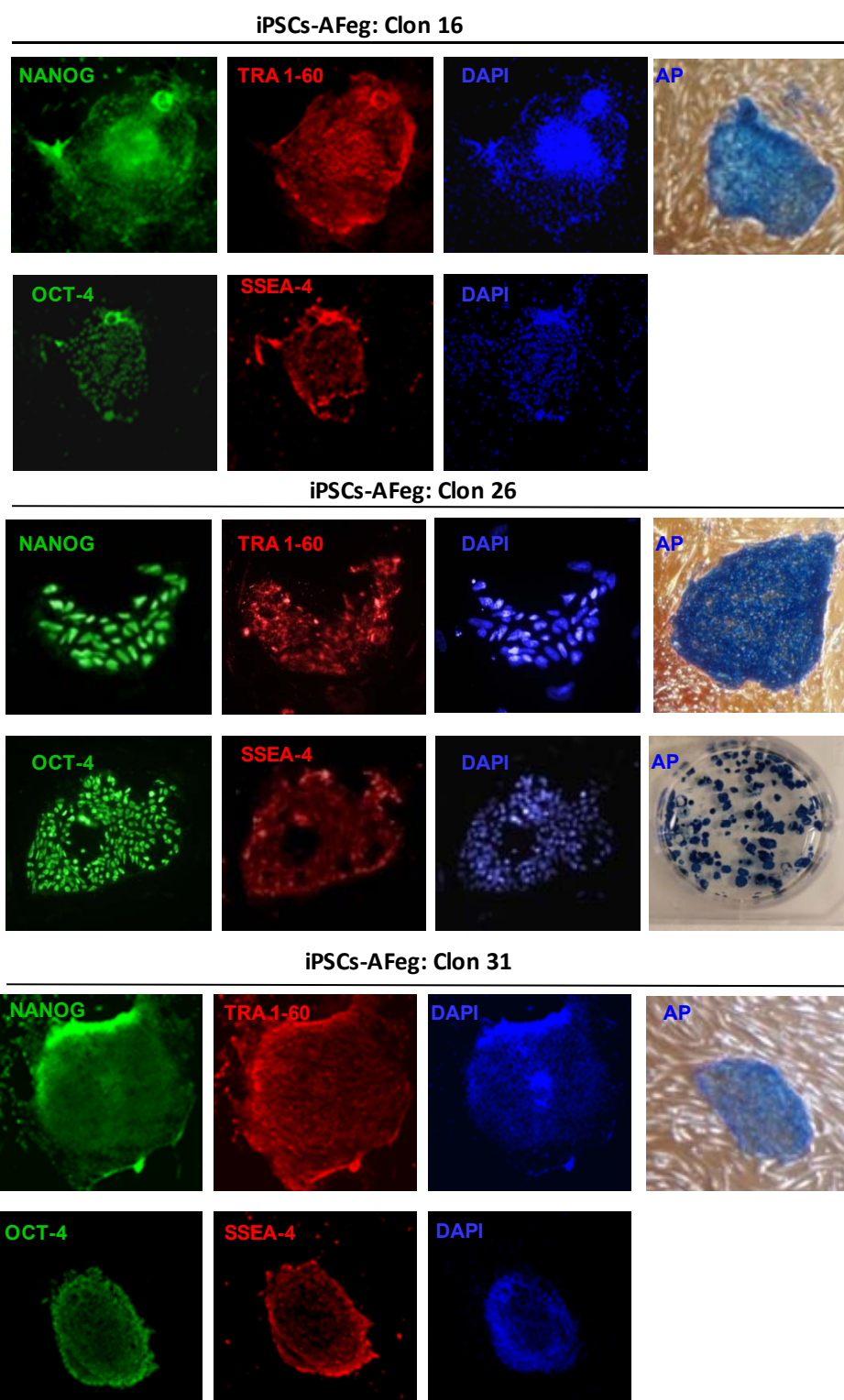


Figura 68. Expresión de los marcadores de pluripotencia por inmunofluorescencia en clones de iPSCs editados genéticamente. Tres de los clones de iPSCs-AFeg (16, 26 y 31) se marcaron con anticuerpos para detectar los marcadores de superficie NANOG (en verde), TRA-1-60 (en rojo) y nucleares OCT-4 (en verde) y SSEA-4 (en rojo). Además, también se detectó en campo claro la presencia de AP. Todos los clones fueron positivos para estos marcadores de pluripotencia.

2.4.2. Expresión de genes endógenos y exógenos de pluripotencia.

Además de la evaluación de los genes de pluripotencia mediante marcaje inmunohistoquímico, se realizó un análisis por RT-qPCR para estudiar si los niveles de expresión de los genes de pluripotencia *NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC* y *REX1* eran similares a los observados

en células madre embrionarias (CME). Efectivamente, se verificó que la expresión de estos genes era equivalente a la existente en dos líneas diferentes de células CME (ES4 y H9) (Fig. 69). Además, se analizó si la expresión de los genes de pluripotencia ectópicos, introducidos en las células a través del vector de reprogramación, se silencia una vez que se desencadena el mecanismo de dediferenciación y los genes endógenos de pluripotencia se activan. Como se observa en la figura 69, el análisis de la expresión de los genes *SOX2* y *OCT4* expresados ectópicamente y de *cMYC* total demostró también el silenciamiento de estos genes en los clones seleccionados.

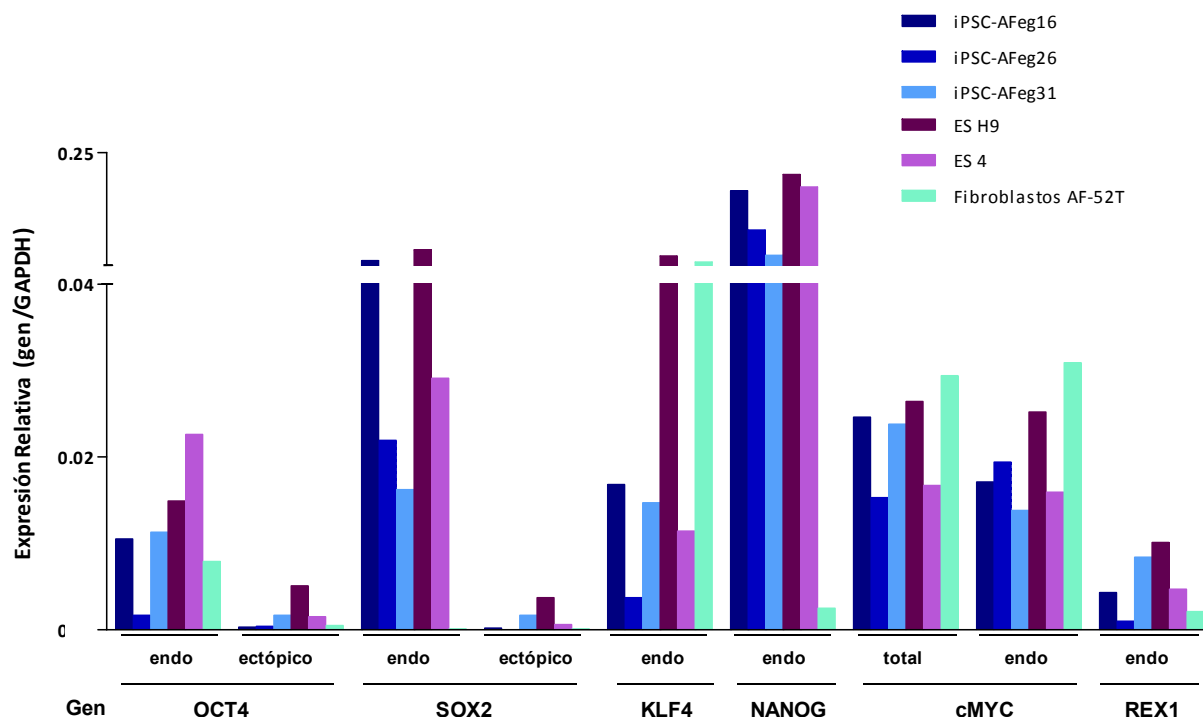


Figura 69. Expresión de los genes endógenos y ectópicos de pluripotencia por RT-qPCR en clones de iPSCs editados genéticamente. Se analizó la expresión de los genes de pluripotencia activados durante la dediferenciación (*Nanog*, *Oct 3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMyc* y *REX 1*) en tres clones de iPSC AF-Aeg. La expresión de estos genes es muy similar a la mostrada por dos líneas de CMEs utilizadas como control positivo (ES4 y H9). Como control negativo se utilizaron los fibroblastos AF-A 52T. Los niveles de expresión están normalizados al gen constitutivo GAPDH.

2.4.3. Generación de teratomas en ratones inmunodeficientes.

Otro estudio adicional para confirmar el estado de pluripotencia de las células iPSCs-AFeg fue la generación de teratomas en ratones NSG (NOD/Shi-scid IL2rgamma(null)). Para ello se inyectaron 1×10^6 células de iPSCs subcutáneamente en ratones NSG. Al cabo de 10-15 semanas se extrajeron los tumores y se analizaron los diferentes tejidos que los conformaban. Todos los clones formaron teratomas, puesto que se observó la formación de nódulos tumorales en los que aparecieron estructuras pertenecientes a las tres capas germinales embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo) (Fig. 70). El ectodermo está representado como epitelio cúbico simple (clon 16) o epitelio poliestratificado queratinizado (clon 26 y 31); el endodermo como epitelio mucoso con células caliciformes similar a la *mucus* del tracto gastrointestinal (clon 16, 26 y 31), acinos pancreáticos (clon 26) o epitelio pseudoestratificado similares al respiratorio (clon 26), y el mesodermo como hueso (clon 16 y 31) o músculo liso alrededor del tejido glandular (clon 26) (Fig. 70).

Además de las tinciones con hematoxilina-eosina, en el clon 16 se realizaron marcajes de inmunofluorescencia para confirmar la existencia de marcadores de las tres capas embrionarias. En las microfotografías se puede apreciar la existencia de tejido positivo para marcadores de ectodermo (β -III Tubulina), de endodermo (FOX2A) y de mesodermo (Brachyury y α -SMA para la detección de tejidos derivados del mesodermo, como el músculo) (Fig. 70)

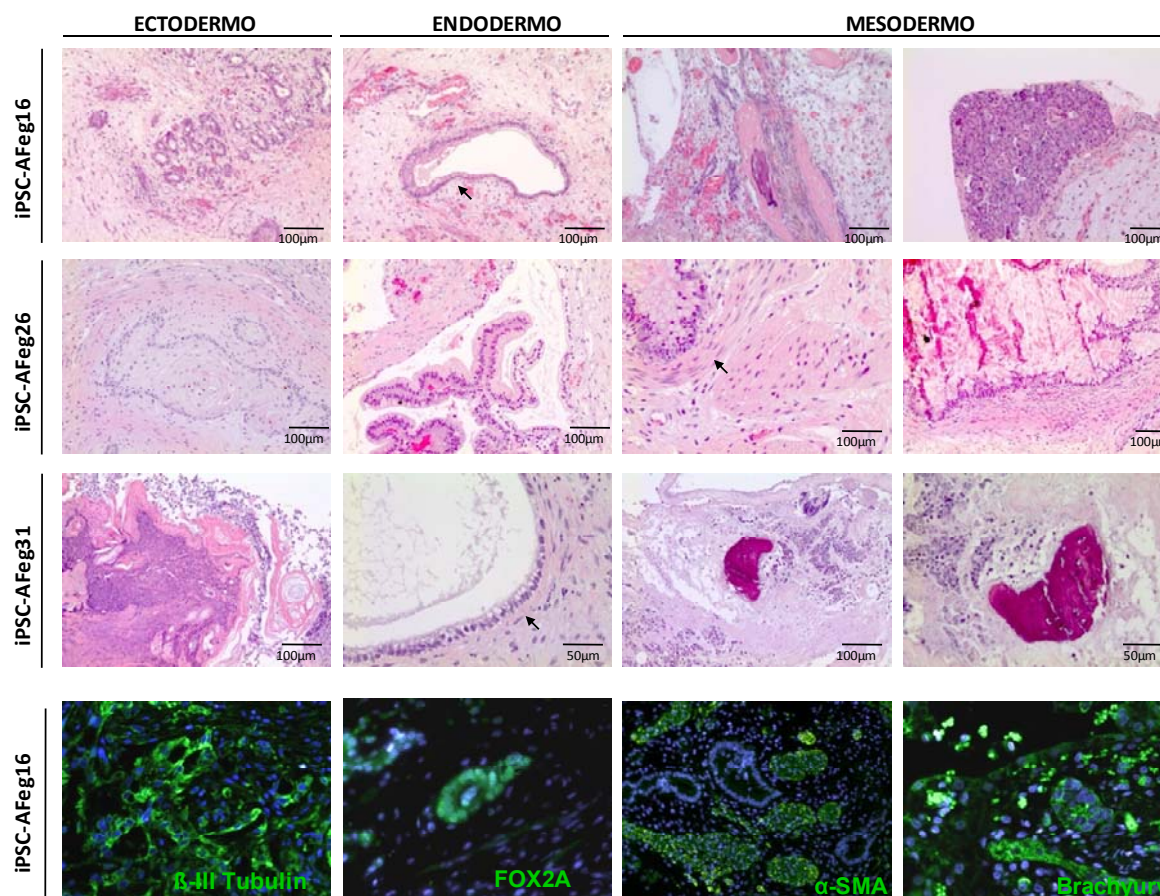


Figura 70. Expresión de los marcadores de pluripotencia en los teratomas derivados de clones de iPSC inoculados en ratones NSG. Las tres primeras filas corresponden a tinciones de hematoxilina-eosina de secciones de teratomas derivados de los clones de iPSC-AFeg 16, 26 y 31 representando las tres capas germinales (ecto-, meso- y endodermo). Las flechas señalan estructuras típicas como el epitelio mucoso con células calciformes (fila 1), el músculo liso debajo de tejido glandular (fila 2), o el músculo liso debajo de epitelio (fila 3). En la última fila se observan microfotografías de inmunofluorescencia para detectar mediante diferentes marcadores específicos del ectodermo (β -II-Tubulina), endodermo (FOX2A) y mesodermo (α -SMA y Brachyury) que se muestran en verde. En azul se muestran los núcleos celulares mediante tinción con DAPI.

2.4.4. Hipometilación de los promotores de *OCT3/4* y *NANOG*.

Existen numerosos artículos que han reportado un cambio en el patrón de expresión de los genes de pluripotencia dependiendo del estado de diferenciación celular, observándose que en las CME éstos se silencian tras su diferenciación debido a diversos cambios epigenéticos, aunque los mecanismos implicados no están del todo claros [545-550]. Uno de los mecanismos epigenéticos más habituales para controlar la expresión génica es la metilación de islas CpG situadas en los promotores de los genes. Por ello, uno de los análisis llevados a cabo típicamente para estudiar el estado de pluripotencia de estas células es el estudio del estado de metilación de promotores de dos genes de pluripotencia, activado cuando la célula está indiferenciada, tales como *OCT3/4* y *NANOG*.

En la figura 71 observamos que tanto el promotor de *OCT3/4* como el de *NANOG* se hipometilan cuando los fibroblastos se reprograman. Es importante destacar que mientras que en el caso de

OCT3/4 esta hipometilación es muy acusada, no es así en el caso de *NANOG*. Esto puede deberse a que, según ha sido descrito, la regulación de *OCT3/4* está fuertemente influenciada por la hipermetilación de las islas CpG del promotor, mientras que en el control de la expresión de otros genes de pluripotencia, como *NANOG* y *SOX2* [547], actúan también otros mecanismos como es la modificación del patrón de histonas [548].

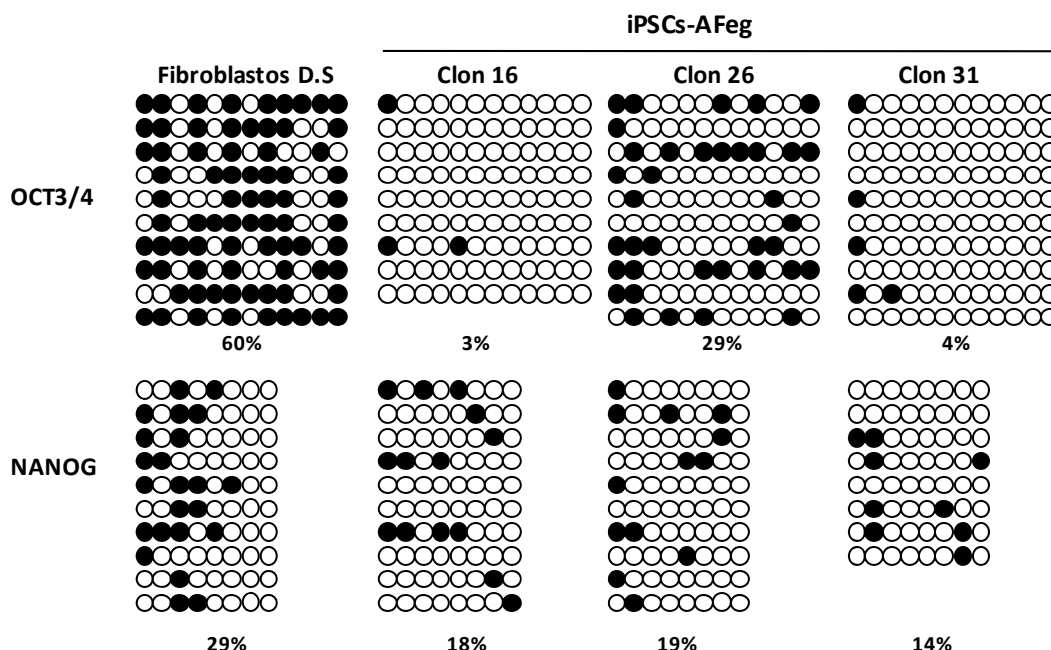


Figura 71. Análisis de la metilación de ADN en islas CpG de los promotores de *OCT3/4* y *NANOG* mediante la secuenciación genómica de bisulfito. Se analizó la metilación de estos promotores en los clones de iPSC AF-Aeg16, 26 y 31 y se comparó con la mostrada por fibroblastos de un donante sano. Los círculos blancos representan dinucleótidos CpG sin metilar y los negros representan dinucleótidos CpG metilados. Debajo de los diagramas se muestra el porcentaje de metilación de islas CpG en cada caso.

2.5. Estudio de la corrección de iPSCs-AF editados genéticamente.

Hasta el momento los resultados mostrados en iPSCs han estado dirigidos a la evaluación de la pluripotencia de estas células, por lo que el siguiente conjunto de resultados se centrará en verificar la expresión de *hFANCA* y la restauración de la ruta de AF en estas células.

2.5.1. Estudio de la expresión del gen *hFANCA* en los clones de iPSC-AFeg.

■ Análisis de la expresión de *hFANCA* por RT-qPCR.

En primer lugar se analizó la expresión de *hFANCA* mediante RT-qPCR. En los tres clones diferentes de iPSC-AFeg (16, 26 y 31) se observa que, en comparación con los fibroblastos parentales AF-52T sin corregir, existe un notable incremento de la expresión de este gen alcanzando niveles de expresión de *hFANCA* muy similares a los existentes en una línea de CMEs de donante sano (H9) (Fig. 72).

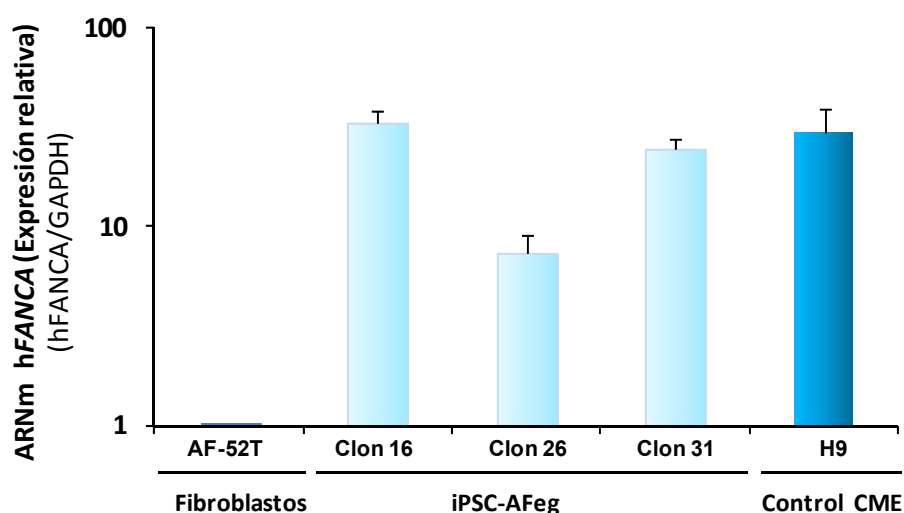


Figura 72. Análisis de la expresión de hFANCA en los diferentes clones de iPSC-AFeg mediante RT-qPCR. La expresión de hFANCA en diferentes clones de iPSCs-AFeg fue similar a la observada en una línea control de CME (H9). La expresión se relativizó al gen constitutivo GAPDH y también a los fibroblastos del paciente AF-52T. En la gráfica está representado el dato correspondiente a la media aritmética y la desviación estándar (n=3).

■ Análisis de la expresión de hFANCA por Western Blot.

A continuación, también se evaluó la cantidad de proteína FANCA expresada por los tres clones. Se observó la presencia de una banda de proteína correspondiente a FANCA (163 kDa) en los tres clones (Fig. 73a). Además, los resultados obtenidos concuerdan con los análisis de expresión de ARNm, ya que la cuantificación de la expresión de la proteína FANCA (Fig. 73b) muestra un perfil prácticamente idéntico al obtenido en la cuantificación de la expresión del ARNm (Fig. 72). Los resultados obtenidos están relativizados a una proteína de expresión constitutiva (β -actina) y, a su vez, al valor de expresión obtenido en el DS.

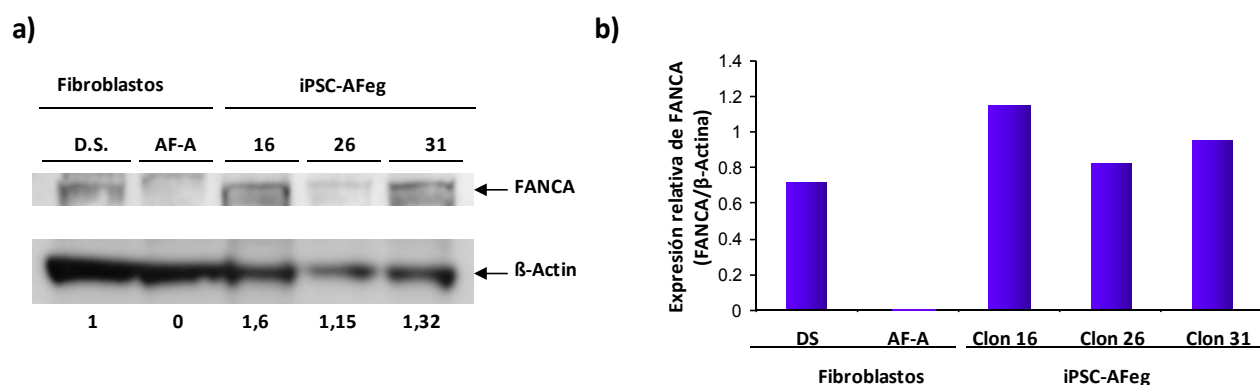


Figura 73. Análisis de la expresión de la proteína FANCA en diferentes clones de iPSC-AFeg mediante Western blot. **a)** Imagen de WB en la que se observa la expresión de FANCA en los tres clones (16, 26 y 31) similar a la observada en los fibroblastos procedentes del DS. En la parte inferior se muestra la cuantificación de FANCA relativizada a la β -actina y a los fibroblastos del DS. **b)** Representación gráfica de la cuantificación de la expresión de FANCA en los tres clones de iPSC y en los fibroblastos de DS. y AF-A.

2.5.2. Estudio de la corrección fenotípica de los clones de iPSC-AF editados genéticamente.

■ Focos nucleares de reparación de FANCD2.

Como ya se ha mencionado anteriormente, para comprobar la completa restauración de la ruta AF se ha analizado la presencia de focos nucleares de FANCD2 en los tres clones a estudio, en ausencia y presencia de un agente entrecruzante del ADN (MMC). En la figura 74 se puede observar

que tras el tratamiento con MMC los tres clones presentan focos de FANCD2, lo que indica que la ruta de Fanconi funciona correctamente.

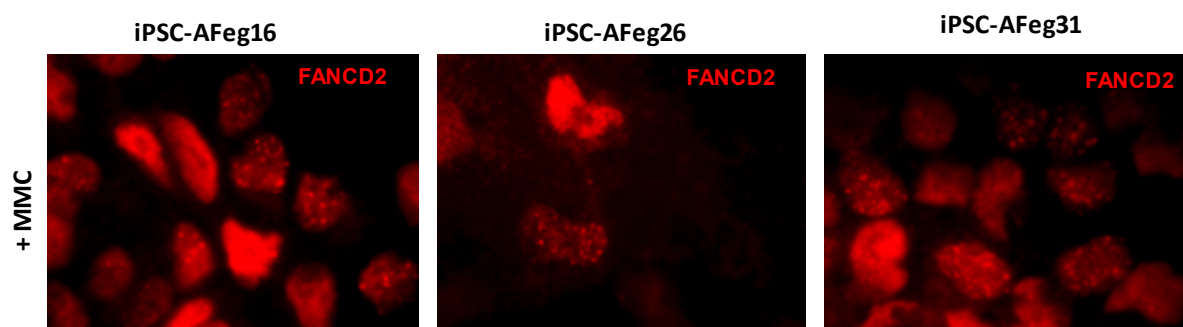


Figura 74. Análisis por inmunofluorescencia de los focos nucleares de FANCD2 en los tres clones de iPSC-AFeg. La presencia de focos de FANCD2 en los tres clones tras la corrección genética por RH muestra que la ruta de Fanconi es funcional.

Estudio de la estabilidad cromosómica en los clones corregidos.

Finalmente, se evaluó la estabilidad cromosómica de los clones cuando estos eran sometidos a daño con DEB como prueba fenotípica adicional para comprobar que la ruta de AF es totalmente funcional. En dos de los clones (16 y 26) se observó la reducción prácticamente total de aberraciones cromosómicas en presencia de DEB, en comparación con lo que ocurre en fibroblastos AF sin corregir (ver fig. 62b). Esto no ocurrió así en el clon 31, por lo que fue descartado para posteriores análisis (Fig. 75).

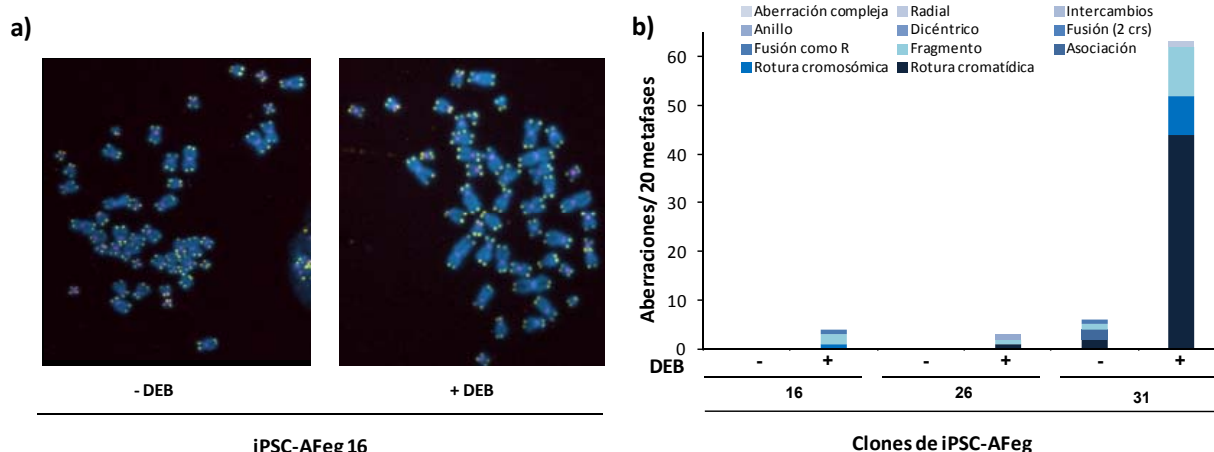


Figura 75. Análisis de la inestabilidad cromosómica inducida por DEB en clones de iPSCs editados genéticamente. a) Imagen representativa del análisis por FISH del clon iPSC-AFeg16 en el que se utilizaron sondas para marcar los telómeros (verde) y los centrómeros (rosa). En este clon no se observaron aberraciones cromosómicas. b) Representación de número de aberraciones por cada 20 metafases en los diferentes clones estudiados antes y después del tratamiento con DEB.

Análisis de la identidad de los diferentes clones de iPSC-AFeg: Estudio de la presencia de la mutación original en el paciente.

Una vez que se verificó la corrección tanto a nivel molecular como funcional de los clones de iPSC derivados de fibroblastos de pacientes AF-A, la pregunta que podía surgir es si esa corrección podría ser consecuencia, no tanto de la introducción del gen *hFANCA* en el locus *AAVS1*, sino a la reversión de la mutación patogénica o a una contaminación cruzada con otra línea celular procedente de un donante sano.

Para responder a esta cuestión se compararon los tres clones diferentes de iPSCs estudiados con una línea de células de DS y con los fibroblastos originales (AF-52T), analizándose los exones del

gen *FANCA* en los exones donde se localizan las mutaciones patogénicas del paciente AF-52, así como las regiones intrónicas adyacentes.

La comparación de las secuencias de ADN confirmó que las mutaciones patogénicas [exón 8 (c.710-5T>C) y exón 36 (c.3558insG)] no habían revertido y que, por lo tanto, la corrección observada era debida a la edición génica realizada (Fig. 76). Además, los resultados también confirman que las iPSC derivan de los fibroblastos del paciente, a partir de los cuáles fueron generadas, y no son el producto de una contaminación con otras líneas celulares durante su manipulación.

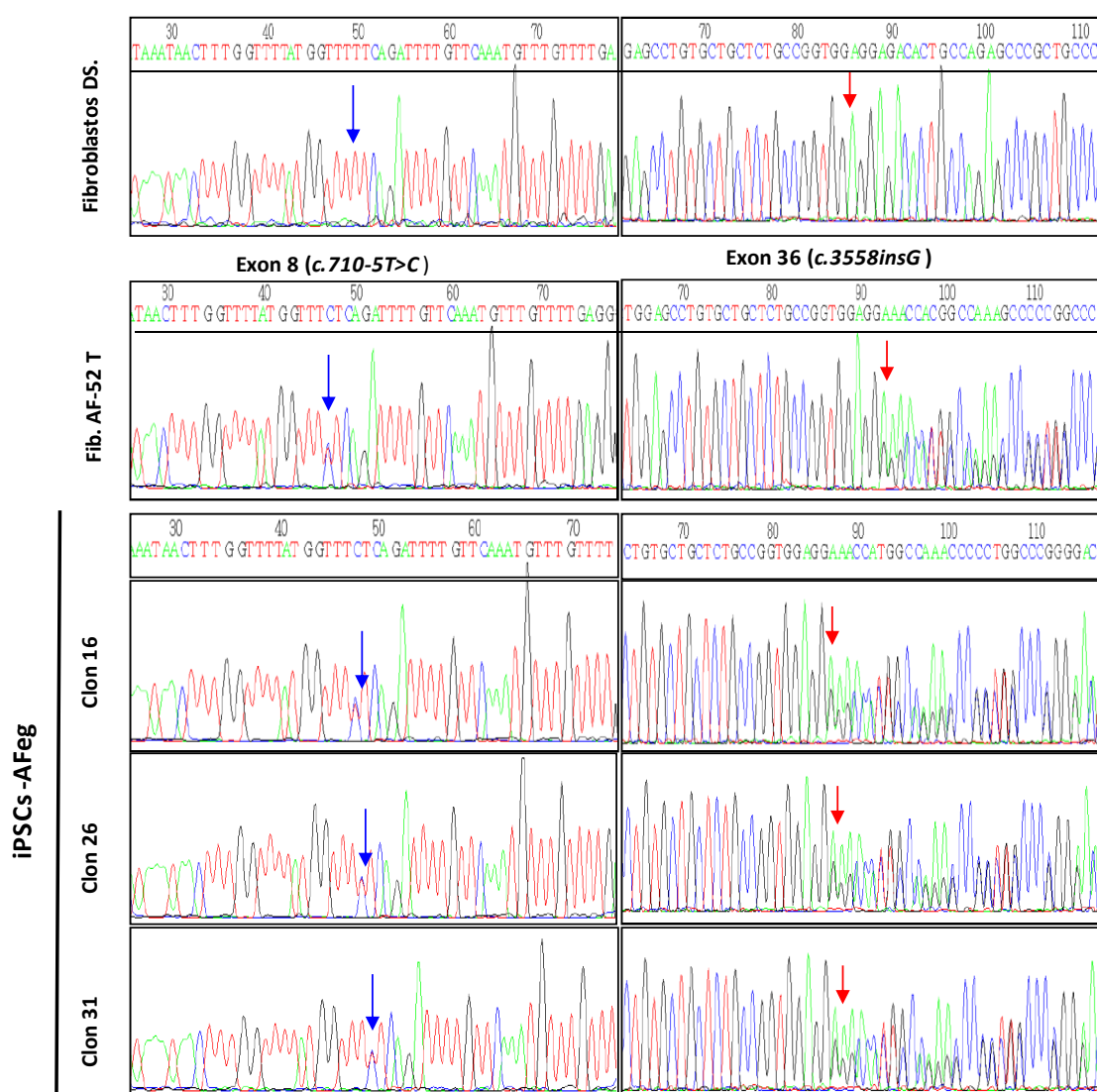


Figura 76. Análisis de secuenciación de la región del exón 8 y 36, donde se localizan las mutaciones patogénicas del paciente AF-52, para verificar la identidad molecular de los tres clones de iPSC-AFeg estudiados. La secuenciación demuestra que los tres clones de iPSCs corregidos contienen las dos mutaciones existentes en los fibroblastos AF-A parentales. Las flechas azules indican la presencia de la mutación c.710-5T>C en el exón 8 en un alelo y las flechas rojas muestran la mutación c3558insG presente en el exón 36 del otro alelo. No se han encontrado mutaciones adicionales ni en las regiones exónicas, ni en las intrónicas adyacentes, descartando la presencia de cualquier mutación que permita la reversión en *cis*.

2.6. Generación de iPSCs-AF editadas genéticamente más seguras: Escisión de los genes de reprogramación.

A pesar de que se observó el silenciamiento de los genes de reprogramación ectópicos una vez que los endógenos se activaron en todos los clones de iPSCs (Fig. 69), la búsqueda de un protocolo más seguro para el potencial uso terapéutico de células derivadas de iPSCs exige la escisión del mayor

número posible de elementos exógenos integrados en el genoma. Con este objetivo se transdujo el clon 16, el que mejor cumplía todos los criterios de pluripotencia, corrección y estabilidad genómica, con un vector lentiviral no integrativo que expresaba la proteína Cre Recombinasa [452] y se generaron nuevos clones.

2.6.1. Caracterización de las iPSC tras la escisión.

Tras la escisión, 30 de los 60 clones progresaron en cultivo y en 14 de ellos se analizó el número de copias del vector de reprogramación, STEMCCA. Los resultados mostraron una reducción en el número de copias de hasta 0,4 copias/célula.

De los clones generados se eligió aquel que presentó un menor número de copias del vector de reprogramación STEMCCA, se analizó su estado de pluripotencia y se verificó que la ruta de AF estaba restaurada.

En primer lugar se estudió el nivel de expresión de los genes de pluripotencia (*SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4*, *NANOG*, *cMYC* y *REX1*) mediante qPCR y, como es de esperar de una iPSC completamente reprogramada, se observó que los genes de pluripotencia endógenos estaban activados mientras que no se detectó expresión de genes exógenos (Fig. 77).

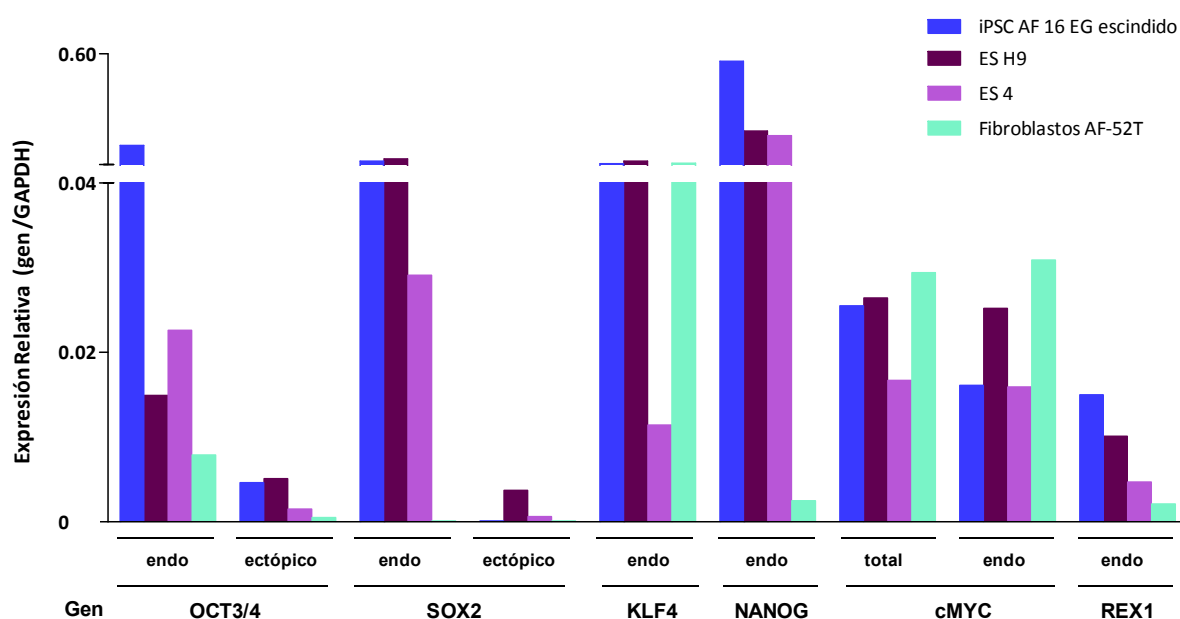


Figura 77. Expresión de los genes endógenos y ectópicos de pluripotencia por RT-qPCR en el clon de iPSC-AFeg16 escindido. Análisis de la expresión de los genes de pluripotencia activados durante la desdiferenciación (*Nanog*, *Oct-4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMyc* y *REX 1*) en el clon escindido de iPSC AF-A eg. La expresión de estos genes es muy similar a la mostrada por dos líneas de CMEs utilizadas como control positivo (ES4 y H9). Como control negativo se utilizaron los fibroblastos AF-52T originales. Los niveles de expresión están normalizados al gen constitutivo GAPDH.

Otra prueba adicional de pluripotencia consistió en el estudio de la metilación de los promotores de genes de pluripotencia en células iPSC-AFeg, mantenidas en cultivo, antes y después de la escisión. Se observó que los promotores de dos de los genes de pluripotencia (*OCT3/4* y *NANOG*) estaban hipometilados en comparación con la línea parental de fibroblastos y además que este nivel de metilación aún era menor que el previamente estudiado en el clon sin escindir, del que procedían (Fig. 78).

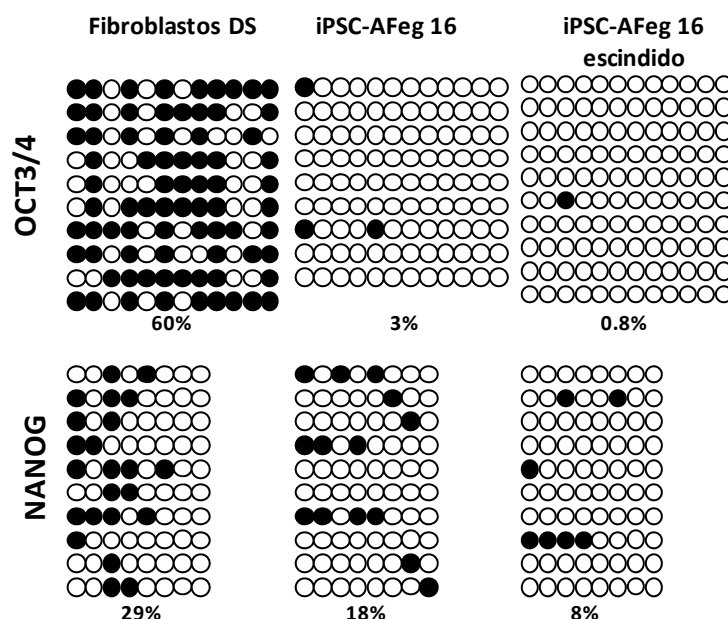


Figura 78. Análisis de la metilación de ADN en islas CpG de los promotores de *OCT3/4* y *NANOG* mediante la secuenciación genómica de bisulfito. La metilación de estos promotores fue analizada en los clones de iPSC-AFeg 16 antes y después de la escisión y se comparó con la mostrada por los fibroblastos parentales. Los círculos blancos representan dinucleótidos CpG sin metilar y los negros representan dinucleótidos CpG metilados. Debajo de los diagramas se muestra el porcentaje de metilación de islas CpG en cada caso.

Además, como análisis *in vivo* para estudiar la pluripotencia de este clon, se comprobó que la inoculación subcutánea de estas células en ratones NSG generaba teratomas con tejidos correspondientes a las tres capas germinales (Fig. 79).

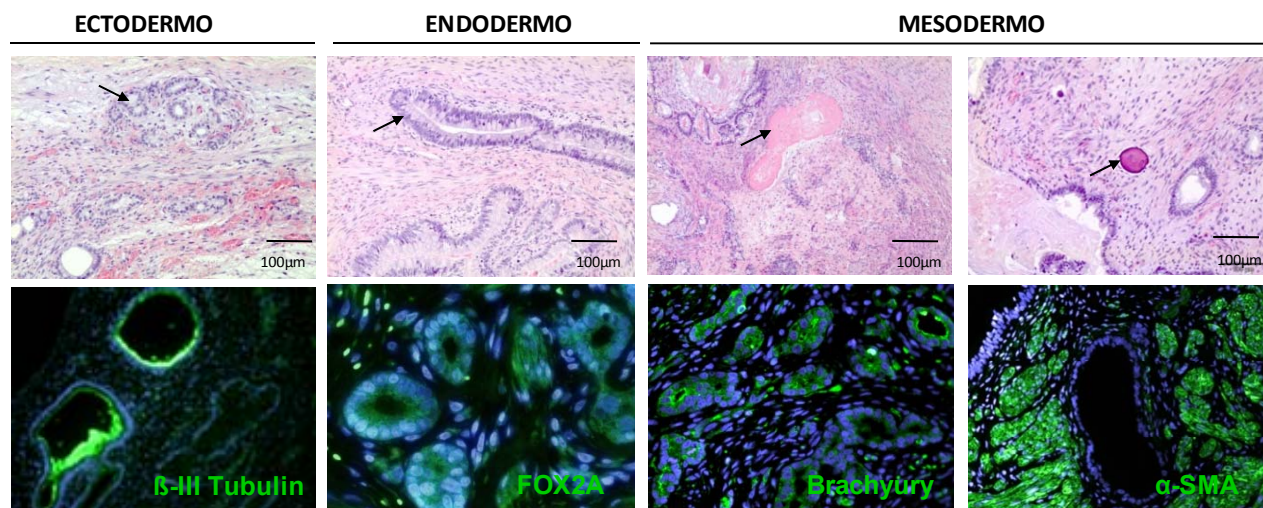


Figura 79. Expresión de los marcadores de pluripotencia en el teratoma derivado del clon iPSC AF-Aeg 16 escindido. En la parte superior se muestra la tinción de hematoxilina-eosina de secciones del teratoma representando las tres capas germinales (ecto-, meso- y endodermo). Con una flecha se indica el ectodermo que está representado por epitelio cúbico simple coincidente con glándulas cutáneas, el endodermo que está representado por estructuras tubulares pseudoestratificadas con presencia de células mucosas, y el mesodermo que aparece como hueso. En la parte inferior se observa el marcaje mediante inmunofluorescencia de diferentes marcadores de ectodermo (β -II-Tubulina), endodermo (FOX2A) y mesodermo (α -SMA y Brachyury).

2.6.2. Estudio de la expresión de hFANCA en el clon escindido.

En este clon también se estudió la expresión del gen hFANCA en comparación con la observada en el clon sin escindir (Fig. 80). Por RT-qPCR se observó que la expresión de hFANCA no había sido alterada tras la escisión del vector de reprogramación.

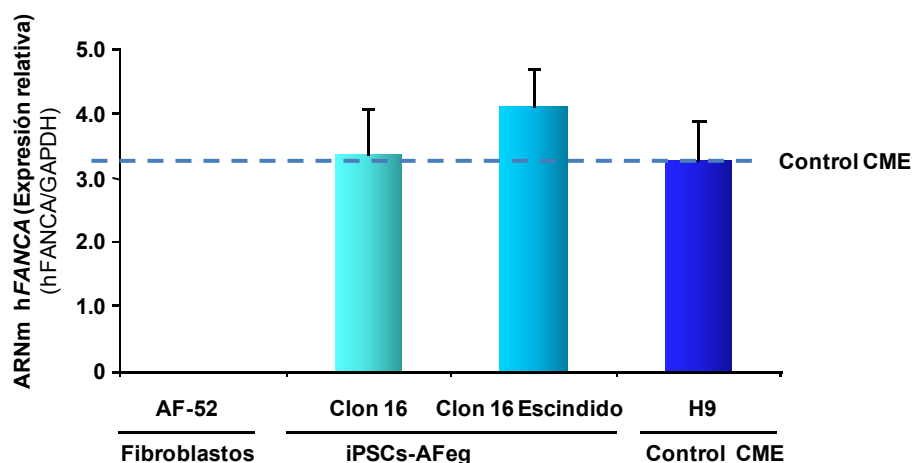


Figura 80. Expresión del gen *hFANCA* en el clon iPSC AF-Aeg 16 tras la escisión del casete STEMCCA. El análisis por RT-qPCR demostró la expresión de *hFANCA* en el clon 16 tras la escisión. Las barras de error se corresponden con el error típico de la media (n=5).

2.6.3. Estudio de la estabilidad cromosómica en el clon escindido.

Para comprobar que la escisión no había afectado a la funcionalidad de la ruta de AF se analizó el número de aberraciones cromosómicas existentes en estas células tras la generación de un daño con DEB. Como puede observarse en la figura 81 el clon iPSC-AFeg16 escindido muestra un número mucho menor de aberraciones cromosómicas tanto en presencia de DEB en comparación con las mostradas por los fibroblastos parentales, lo cual indica que la ruta de AF es funcional en estas células.

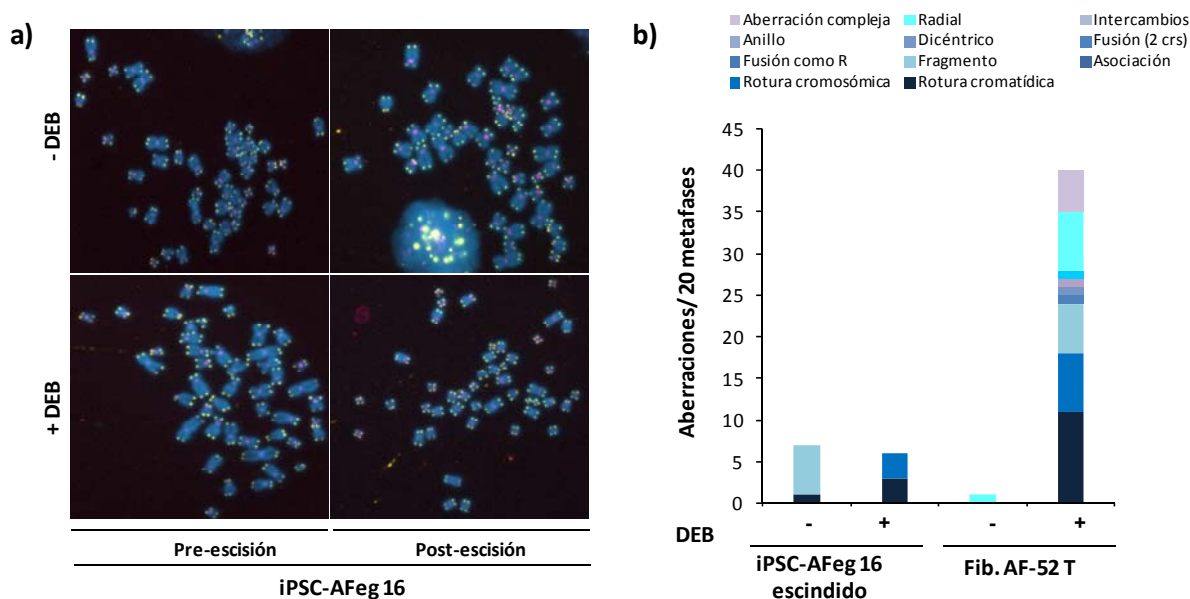


Figura 81. Análisis de la inestabilidad cromosómica inducida por DEB en el clon de iPSC escindido. **a)** Imagen representativa del análisis por FISH del clon iPSC-AFeg16 escindido y sin escindir con y sin DEB. Se utilizaron sondas para marcar los telómeros (verde) y los centrómeros (rosa). En este clon no se observaron aberraciones cromosómicas. **b)** Cuantificación del número de aberraciones por cada 20 metafases en el clon iPSC-AFeg16 escindido antes y después del daño con DEB en comparación con los fibroblastos parentales AF-52T, también utilizados en la figura 62b.

2.7. Análisis del cariotipo y estudios de la variación del número de copias mediante una matriz de CGH.

Con el objetivo de poder utilizar las iPSC-AFeg en futuras aplicaciones terapéuticas uno de los requisitos que éstas deben cumplir es que sean genéticamente estables. Debido a la complejidad del

protocolo utilizado para la generación de estas células y a la elevada inestabilidad propia de las células de pacientes con AF, existen varios pasos en los cuales es posible la adquisición de anomalías genéticas: immortalización, corrección por recombinación homóloga, reprogramación y escisión. De este modo, se ha observado que cuando las células son reprogramadas y mantenidas en cultivo como iPSCs los clones adquieren ciertas anomalías que pueden ser consecuencia del mantenimiento en cultivo de estas células y su expansión [551-554].

Por ello, en primer lugar analizamos el cariotipo de los clones seleccionados, de modo, que se observó que el clon 26 presentaba duplicaciones del cromosoma Y, por lo que fue descartado para posteriores análisis; mientras que el resto de los clones presentaron un cariotipo normal.

En segundo lugar, y para analizar en más detalle la estabilidad de nuestros clones, recurrimos a un análisis más exhaustivo, como es el análisis de la matriz de CGH (hibridación comparativa del genoma). Este estudio reveló leves alteraciones genéticas en nuestros clones (tabla 16). Puesto que se observó que no existían diferencias genéticas, según el análisis de CGH, entre los fibroblastos del paciente AF-52 y las mismas células tras ser immortalizadas con *hTERT* y corregidas genéticamente por RH, se dedujo que las alteraciones genéticas observadas en los clones no son debidas a pasos previos a la reprogramación. Esto sugiere que el proceso de telomerización, edición génica y expansión *in vitro* no induce alteraciones detectables por CGH en el genoma de las células.

Sin embargo, sí que se observaron leves alteraciones en los clones de iPSC generados a partir de fibroblastos AF-52T editados genéticamente. Estos resultados están en concordancia con trabajos publicados que verifican que las aneuploidías y ganancias y pérdidas de material genético son habituales en CMEs humanas e iPSCs y que éstas se generan durante el proceso de reprogramación en el caso de las iPSCs y/o expansión tanto en caso de las iPSCs como de las CMEs [555].

Células		Análisis CGH						Cariotipo
		Alteración	Locus	Citobanda	Inicio	Fin	Tamaño	GENES OMIM
Fibroblastos AF-52 ¹		-	-	-	-	-	-	46 XY
Fibroblastos AF-52T ² eg		-	-	-	-	-	-	46 XY
Clones iPSC -AF eg	Clon 16 ³	Deleción	16p12.2p12.1	chr16:22211121-24730051	22211121	24730051	2.51893	*
	Clon 16 escindido ³	Deleción	16p12.2p12.1	chr16:22211121-24730051	22211121	24730051	2.51893	*
		Trisomía Mosaico	5	chr5:22149-180712263	22149	180712263	180.690114	-
	Clon 31 ³	Deleción	16p12.2p12.1	chr16:22211121-24730051	22211121	24730051	2.51893	*
		Trisomía	20	chr20:29611649-62949290	29611649	62949290	33.337641	
	Clon 26	No Analizado						48XYY

Tabla 16. Estudio de las alteraciones genéticas mediante análisis de CGH y cariotipo en los clones de iPSCs editados genéticamente.

*EEF2K, CDR2, HS3ST2, SCNN1G, SCNN1B, COG7, GGA2, EARS2, NDUFAB1, PALB2, DCTN5, PLK1, ERN2, PRKCB, CACNG3, RBBP6

¹ Los fibroblastos del paciente AF-A 52 fueron comparados con un control de ADN masculino de Promega.

² Comparación entre fibroblastos AF-A 52 y fibroblastos AF-A 52 T eg.

³ Comparación entre fibroblastos AF-A 52T eg y clones de iPSC generados a partir de ellos tras la reprogramación.

2.8. Generación de Progenitores Hematopoyéticos corregidos a partir de iPSCs AF-A editadas genéticamente.

Como ya se mencionó en la introducción de esta tesis, uno de los problemas más graves de los pacientes con AF es la aplasia medular, por lo que el objetivo final de nuestro trabajo es generar progenitores hematopoyéticos (PHs) corregidos mediante edición génica a partir de células somáticas del propio paciente. Con este propósito se muestra el último conjunto de experimentos dirigidos a la generación de PHs corregidos a partir de iPSCs corregidas por terapia génica dirigida.

2.8.1. Diferenciación hematopoyética *in vitro* a través de la formación de cuerpos embrionarios.

La diferenciación hematopoyética se llevó a cabo siguiendo un protocolo modificado del grupo del Dr. Lanza [556, 557] en dos clones de iPSCs, el clon iPSC-AFeg16 y el clon iPSC-AFeg16 escindido, con el fin de comparar el efecto de la escisión en la capacidad de diferenciación hematopoyética de las iPSCs.

Como se puede observar en la figura 82, tras 21 días en cultivo en presencia de citoquinas hematopoyéticas, las iPSCs dieron lugar a diferentes poblaciones de células hematopoyéticas:

- $CD34^+/CD43^+$: Estos marcadores se expresan en progenitores tempranos, en un estado de indiferenciación precedente al progenitor hematopoyético, pero que ya están comprometidos al desarrollo hematopoyético [558].
- $CD34^+/CD45^+$: Representa a la población específica de progenitores hematopoyéticos humanos multipotentes.

Aunque no se consiguió una completa escisión del casete de reprogramación, según los resultados de qPCR, sí que se puede observar que la escisión mejoró la capacidad de diferenciación hematopoyética de las iPSCs. Previamente se había reportado que la escisión de los genes de reprogramación mejoraba el potencial de diferenciación de las iPSCs [516, 559]. En la figura 82 se puede apreciar que a partir del clon escindido se alcanzó un 12,6% de células $CD45^+$ y un 6,9% de células dobles positivas para $CD34^+/CD45^+$, mientras que en el caso del clon no escindido estos valores fueron de 3,3% y 3,0% respectivamente.

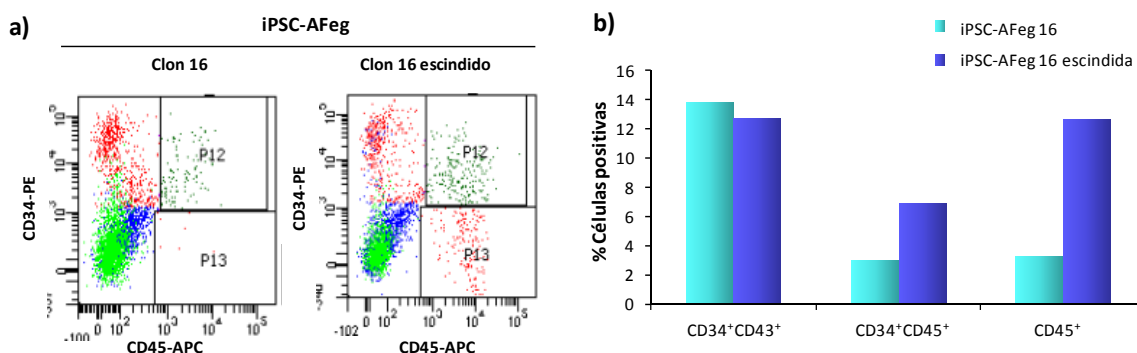


Figura 82. Generación de células hematopoyéticas a partir de dos clones de iPSC AF-Aeg: el clon 16 y el escindido generado a partir de éste. a) Análisis representativo de citometría de flujo de la expresión de $CD34^+$ y $CD45^+$ humanos en los PHs derivados del clon iPSC AF-Aeg 16 antes y después de la escisión de los genes de reprogramación. **b)** Porcentaje de células $CD43^+CD34^+$, $CD45^+CD34^+$ y $CD45^+$ antes (azul claro) y después (azul oscuro) de la escisión del casete de reprogramación, medido por citometría de flujo.

2.8.2. Capacidad de formación de colonias a partir de Progenitores Hematopoyéticos diferenciados de iPSC AF-A editados genéticamente.

Para comprobar el potencial hematopoyético de las células diferenciadas se cultivaron estas células en metilcelulosa suplementados con factores hematopoyéticos humanos, para favorecer la formación de colonias hematopoyéticas. En la figura 83 se puede observar que tanto el clon de iPSC escindido como el no escindido dan lugar a colonias pertenecientes tanto al linaje mieloide (UFC-GMs, unidades formadoras de colonias granulomacrofágicas), como al eritropoyético (BFU-Es, del inglés *burst forming unit-erythroid*). De nuevo se puede apreciar que la escisión de los genes de reprogramación favorece el potencial de diferenciación en comparación con el clon no escindido.

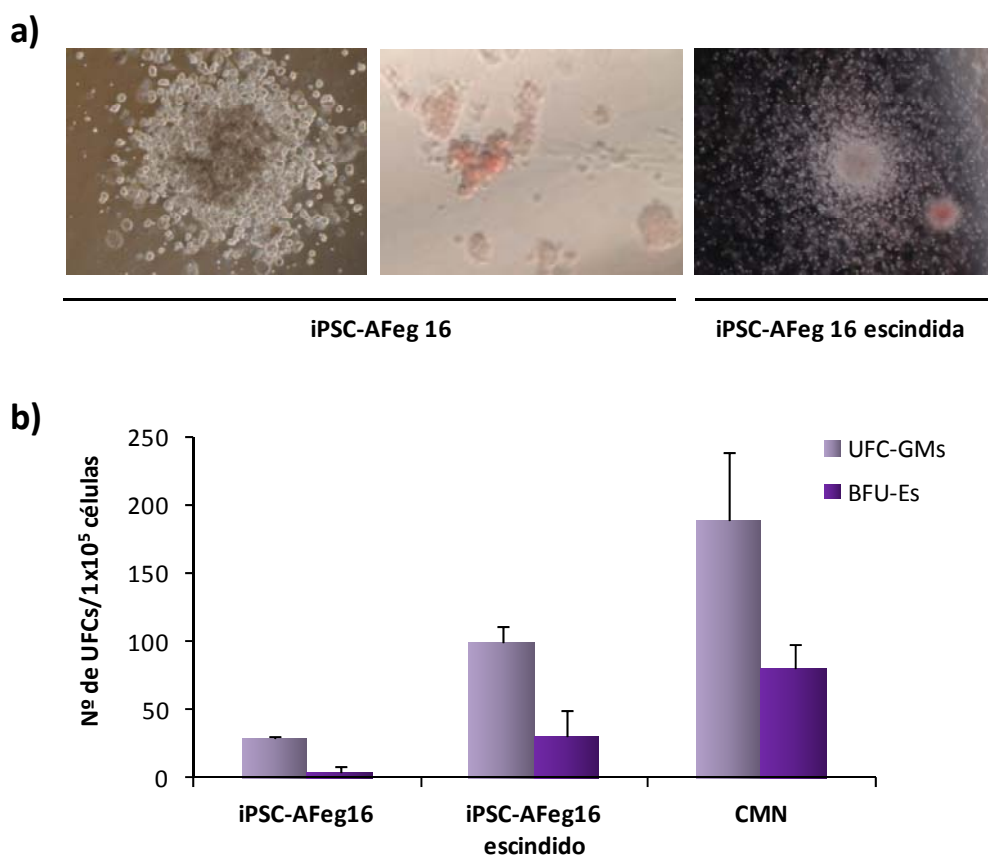


Figura 83. Capacidad de formación de colonias hematopoyéticas a partir de células derivadas del clon iPSC-AFeg16 antes y después de la escisión de los genes de reprogramación. a) Microfotografías de los progenitores hematopoyéticos (UFC-GMs y BFU-Es) generados a partir del clon iPSC-AFeg16 escindido y sin escindir y de CMN (células mononucleadas). b) Cuantificación de la capacidad clonogénica de iPSCs-AFeg16 antes y después de la escisión. Se han realizado tres réplicas intra-experimento y las barras de error representan el error típico de la media.

2.8.3. Resistencia a MMC de Progenitores Hematopoyéticos diferenciados de iPSC AF-A editados genéticamente.

En último lugar y como prueba de la funcionalidad de la ruta de AF en los progenitores hematopoyéticos obtenidos tras la diferenciación del clon de iPSC-AFeg 16, se verificó su resistencia a MMC. En la figura 84 se puede observar que los progenitores hematopoyéticos diferenciados a partir del clon de iPSC-AFeg16, mostraron un nivel de

resistencia a MMC muy similar al observado en progenitores de sangre de cordón de un donante sano. Además el porcentaje de supervivencia a MMC de PHs del clon iPSC-AFeg16 fue claramente superior al porcentaje de PHs procedentes de médula ósea (MO) de dos pacientes de AF (AF-664 y AF-82). Estos resultados confirmaron la reversión del fenotipo de AF también a nivel de progenitores hematopoyéticos generados a partir de células corregidas por RH.

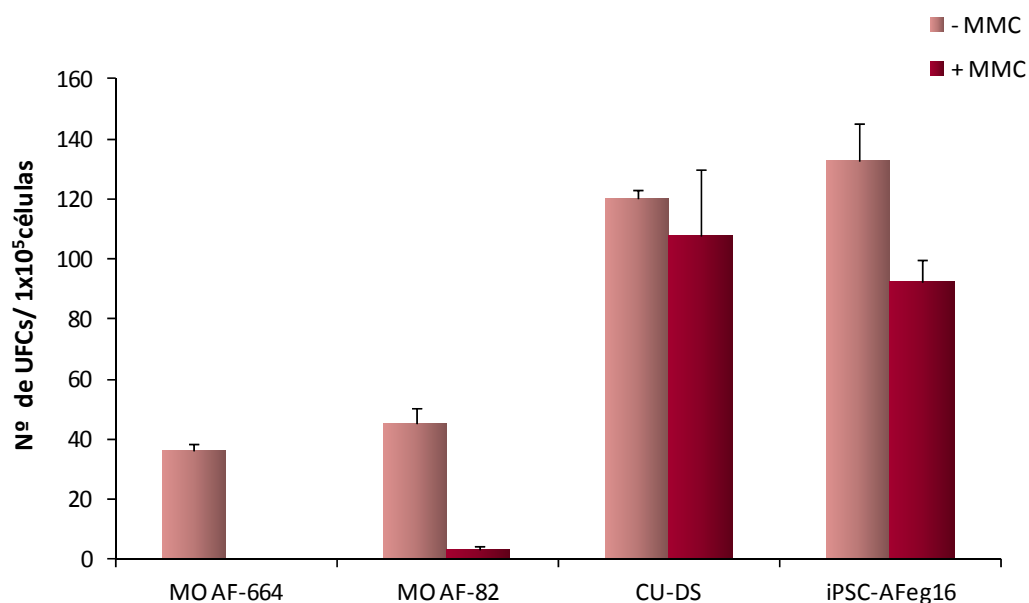


Figura 84. Resistencia a MMC de progenitores hematopoyéticos diferenciados a partir del clon iPSC-AFeg 16. El número de UFCs generadas a partir de PHs del clon 16 en presencia de MMC fue similar al mostrado por UFCs generadas a partir de sangre de cordón umbilical de un donante sano (CU-DS), y mucho mayor que el existente en UFCs generadas a partir de MO de dos pacientes de AF (AF-664 y AF-82). (n=3, las barras de error representan el error típico de la media)

V. DISCUSIÓN

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad de baja prevalencia caracterizada principalmente por una alta frecuencia de malformaciones congénitas, elevada predisposición al cáncer y aplasia medular [1-3]. A pesar de la alta heterogeneidad sintomatológica de la enfermedad, la principal causa de muerte en los pacientes sigue siendo el fallo de médula ósea, cuya patofisiología sigue sin haber sido dilucidada completamente [4, 5].

El objetivo principal del trabajo de nuestro laboratorio en el campo de la AF se centra en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas del problema hematológico de estos pacientes de AF y en la investigación de las causas del desarrollo de la aplasia medular.

Con este fin, a lo largo de este trabajo presentamos el desarrollo y validación de un modelo humanizado de ratón que reproduce los principales síntomas hematológicos observados en pacientes y que permite, entre otras aplicaciones, validar la eficacia de vectores diseñados para ser utilizados en terapia génica de pacientes con AF-A. Además, también se ha diseñado un protocolo de generación de progenitores hematopoyéticos corregidos genéticamente a partir de iPSCs derivadas de fibroblastos de pacientes con AF-A previamente corregidos por edición génica.

A continuación se discutirán en detalle cada una de las herramientas desarrolladas en este trabajo, sus características y su relevancia para el tratamiento de la patología que nos ocupa.

1. GENERACIÓN DE UN MODELO HUMANIZADO DE RATÓN DE AF-A UTILIZANDO VL:shARNs.

Como se ha mencionado, la generación de un modelo humanizado de AF fue uno de los principales objetivos planteados a lo largo de esta tesis. La idea de llevar a cabo esta tarea surgió de la necesidad de disponer de un modelo adecuado para estudiar el comportamiento *in vivo* de las células de pacientes con AF y para buscar y validar nuevos tratamientos para la AF.

Aunque es cierto que existen numerosos modelos animales que desarrollan parte de las características fenotípicas debidas a la enfermedad (ver introducción Tabla 2), ninguno de ellos reproduce completamente el problema hematológico detectado en los pacientes. Así pues, la creación de un modelo animal en ratones inmunodeficientes trasplantados con células progenitoras hematopoyéticas obtenidas de pacientes de AF podría parecer una solución a este problema. Sin embargo, existen varias limitaciones que han impedido realizar un modelo animal humanizado de AF reproducible hasta el momento, siendo el principal obstáculo la difícil disponibilidad de muestras de MO de pacientes con AF, a su limitada celularidad y la alta sensibilidad de su manipulación *in vitro*.

Para solventar este problema nos planteamos utilizar como fuente celular progenitores hematopoyéticos de donantes sanos, cuya disponibilidad no supondría tal limitación, y generar con ellos un modelo de la patología mediante la inhibición estable de uno de los genes participantes en la ruta de AF. En nuestro caso particular se ha elegido el gen *FANCA* como diana para ser inhibida, ya que es el gen más frecuentemente mutado en los pacientes con AF, representando en la población española con AF el 80% de los pacientes [33].

La estrategia llevada a cabo para realizar la inhibición del gen *hFANCA* fue por medio de la utilización de vectores lentivirales que expresan de forma constitutiva horquillas pequeñas de ARN

(shARN) cuya diana es el ARNm del gen *hFANCA*. La justificación de la utilización de este tipo de vectores se apoyó en varios fundamentos:

- Por un lado, ya se había estudiado que estos shARNs inhibían la expresión de los genes al iniciar la respuesta al ARNi de forma endógena, sin desencadenar la respuesta a interferón que se produce cuando se introducen en la célula ARNs de más de 30 NT [178].
- Además, también estaba descrito que se expresaban de forma eficiente en células humanas [179], lo que los convertía en una herramienta válida para nuestro trabajo.
- Por último y para apoyar el uso de shARNs como una herramienta eficaz para suprimir la expresión del gen *FANCA* y que la inhibición a nivel de ARNm es suficiente para generar un fenotipo de AF-A, nos basamos en publicaciones que muestran que los pacientes AF-A no generan un ARNm funcional que permitan la expresión de la proteína funcional correspondiente, produciendo como consecuencia el fenotipo patológico [560]. Por ello postulamos que, una inhibición de la expresión de *FANCA* a nivel del ARNm en células de donantes sanos sería suficiente para observar el fenotipo de AF.

Para conseguir que la expresión de estos shARNs ocurriera de forma estable en la célula optamos por la utilización de un vector lentiviral (pLVTHM) descrito por Wiznerowicz y col. [182], que permite la inserción del shARN en el genoma celular y el seguimiento de las células transducidas, gracias a que esta secuencia se coexpresa junto con la proteína eGFP, que actúa como marcador. Además, hay que recalcar que este vector presenta un sistema que permitiría la expresión inducible del shARN en el momento más adecuado, en el caso de que la inhibición del gen *FANCA* hubiera resultado letal para las células.

Esto nos permitió obtener, a partir de células hematopoyéticas sanas, células con fenotipo similar a las células de AF que pudieron ser trasplantadas en un modelo de ratón inmunodeficiente (NOD/SCID o NOG). De este modo se generó un modelo *in vivo*, basado en el trasplante de progenitores hematopoyéticos humanos con inhibición del gen *FANCA* en ratones inmunodeficientes, que nos permitió disponer de un modelo humanizado de la enfermedad sobre el que estudiar el comportamiento de las células con AF *in vivo*.

1.1. Diseño de diferentes VL:shARNs frente al gen *FANCA*.

Como paso inicial en este trabajo y con el objetivo de inhibir el gen *FANCA*, se diseñaron tres vectores lentivirales que expresaban de forma constitutiva shARNs frente al gen *FANCA* y se evaluó si el nivel de reducción de la expresión de este gen era suficiente como para reproducir el fenotipo de AF en una línea celular humana.

Antes de continuar cabe aclarar que la elección de vectores lentivirales (VLs), en lugar de otros vectores comúnmente utilizados como los γ -retrovirales (RVs), para la expresión de los shARNs se fundamentó en que los primeros presentaban ventajas que favorecían el alcance del propósito que nos habíamos planteado. Una de las ventajas más relevantes que nos proporcionaban estos vectores, es que los VL transducen células quiescentes [227, 230, 561-564], característica que es de vital importancia en nuestro trabajo ya que para la generación del modelo de AF se inhibió la ruta de AF en CMHs que, fisiológicamente, se encuentran principalmente en estado quiescente. Además, hay que añadir que se trata de vectores clínicamente más seguros puesto que presentan menor riesgo de

oncogénesis insercional y transactivación que los vectores γ -RVs [207, 565-567]. Esto es debido, entre otros factores, a que los VLs tienden a integrarse dentro de unidades completas de transcripción, por lo que son menos genotóxicos que los γ -RV que tienen preferencia por integrarse en regiones próximas a sitios de inicio de la transcripción, islas CpG y sitios hipersensibles a ADNasa I y regiones reguladoras de genes [206, 208, 212, 566, 568]. En nuestro caso, para aumentar la seguridad del protocolo se utilizan, además, VLs autoinactivantes (con una delección en la LTR 3') que reduce el potencial de transactivación de genes vecinos [228]. Por todo ello, estos vectores son los elegidos preferentemente para expresar de forma estable y a largo plazo el shARN y así lograr la reducción de la expresión de un determinado gen [181, 182, 569-572].

Una vez elegido el sistema de transporte de los shARNs se procedió al diseño de éstos. Se generaron shARNs dirigidos frente a una región del ADN codificante del gen *FANCA*, es decir frente a región de la secuencia que se traducirá directamente a proteína. Es importante mencionar que existe otra estrategia para inhibir la expresión de un gen y ésta consiste en utilizar shARNs dirigidos frente a la región 3'UTR (del inglés *untranslated region*) de los genes. Sin embargo hay que mencionar que los shARNs dirigidos contra la región 3'UTR presentan dos importantes desventajas con respecto a los shARNs que se unen directamente al ADNc del gen diana. La primera es que la inhibición que ejercen sobre la diana es menos eficaz debido a que la accesibilidad a su región de unión, la UTR, se ve dificultada por proteínas que se unen a esta zona y que participan en la regulación de la transcripción, por ello en los protocolos de diseño de shARN se recomienda no utilizar esta región como diana cuando sea posible [573]. La otra desventaja y aún más relevante, es que las regiones 3' UTR tienen una elevada tolerancia a la unión inespecífica de shARN, lo que tiene como consecuencia efectos de *off-targeting* [574-576]. Sin embargo, los shARNs que se unen directamente al ADNc también presentan una notable desventaja y es que, teniendo en cuenta que uno de los objetivos de nuestro trabajo es estudiar el efecto de la terapia génica, nuestro shARNs no sólo inhibirán la expresión del gen endógeno, sino que también inhibirá el gen *FANCA* introducido ectópicamente por medio de un vector terapéutico para corregir el fenotipo AF. A pesar de ello, este problema pudo ser solventado, como se explicará más adelante, gracias la generación de mutaciones silentes o sinónimas en la zona del shARN complementaria al gen *FANCA*, de modo que los vectores lentivirales terapéuticos que expresen el gen *FANCA* no fueran diana de los shARNs generados [577].

En resumen, para la inhibición estable del gen *FANCA* en células sanas se utilizaron tres shARNs (sh6*FANCA*, sh7*FANCA*, sh8*FANCA*) dirigidos frente a una región del ADNc del gen *FANCA* y contenidos en vectores lentivirales. La eficacia de estas secuencias para unirse e inhibir el gen *FANCA* ya había sido descrita anteriormente [136], aunque únicamente se estudió su efecto cuando estas secuencias eran utilizadas como ARNs que se transfectaban en las células y que por tanto, se expresaban de forma transiente. Como novedad, nosotros estudiamos si estos ARNs eran válidos para realizar una inhibición estable a largo plazo cuando eran transducidos como VL:shARNs. Además, se utilizó como control un vector lentiviral que contenía un shARN, cuya secuencia no posee una diana conocida en el genoma humano.

1.2. Eficacia de diferentes VL:shARNs para inhibir la expresión de *FANCA* en células sanas.

Para estudiar la eficacia de inhibición de los shARNs generados, en primer lugar, se transdujo una línea de células humana (MRC5) con los VL:shARNs y se estudió su comportamiento debido al efecto producido por la expresión del shARN.

■ Disminución de la proliferación en células interferidas.

Una de las características de las células de AF es que muestran una proliferación reducida [578]. Esta particularidad fue corroborada en las células MRC5 transducidas con los VL:shARN tras estudiar su expansión a lo largo del tiempo, ya que éstas mostraban una reducción de la expansión celular de hasta diez veces respecto a las células control, lo cual podría indicar que el gen *FANCA* estaba siendo inhibido. Además, se verificó que la disminución en la proliferación era una consecuencia debida al efecto inhibitor del shARN y no a otras causas, estudiando el valor de la IMF de las células transducidas con los distintos vectores, ya que la medición de este parámetro nos reveló que había una disminución en el porcentaje de IMF en las células que expresaban los shARNs, especialmente en el caso del sh7*FANCA* y del sh6*FANCA*, y no en las células control. Esta disminución en la proliferación también se observa en las células con fenotipo de AF, tanto en modelos animales [143, 520] como en las células de pacientes con AF [579].

Es importante resaltar que es necesario alcanzar niveles de transducción cercanos al 100%, que éstos permanezcan estables a lo largo del tiempo y que sean similares en todas las líneas celulares transducidas con los distintos vectores para poder comparar el efecto de los shARNs en las células transducidas. En un principio, el porcentaje de células transducidas con el vector VL:sh8*FANCA* fue mucho menor que el obtenido con el resto de los vectores, por lo que estas células fueron seleccionadas positivamente para el marcador GFP y así se dispuso de una población que expresaba el shARN en un porcentaje cercano al 100%. Así pues, todos los resultados mostrados en los que se comparan las poblaciones de células transducidas con los distintos VL:shARNs tuvieron niveles similares de transducción.

■ Inhibición de la ruta AF a nivel molecular.

Para confirmar si las diferencias que inicialmente se habían apreciado en la proliferación se debían a la inhibición del gen *FANCA*, se cuantificó la expresión del gen *FANCA* endógeno en células transducidas con vectores que portan los shARNs a estudio (VL:sh6*FANCA*, VL:sh7*FANCA* y VL:sh8*FANCA*) y se relativizaron los resultados a un control (células transducidas con VL:shscramble) tanto a nivel de ARNm por qPCR, como a nivel de proteína por WB.

A nivel de ARNm se observó que en el caso de las células que expresaban los sh6*FANCA* y sh7*FANCA* existía una reducción de prácticamente el 100% de la expresión de *FANCA* en las células transducidas y que ésta se mantenía a lo largo del tiempo, lo cual no ocurría en las células transducidas con el sh8*FANCA*, ya que aunque se partía de un grado de inhibición alto (88%) éste no era estable a lo largo del tiempo. Este resultado, perfilaba tanto el sh6*FANCA*, como el sh7*FANCA* como buenos candidatos para su utilización en la generación de modelos con fenotipo AF.

En segundo lugar, se evaluó el nivel de proteína FANCA en estas células y se estudió su correlación con el nivel de expresión del ARNm. Curiosamente y, a pesar de que las células transducidas con VL:sh6FANCA y VL:sh7FANCA presentaban un efecto similar sobre la expansión celular, se observó que mientras que la disminución de la proteína FANCA era prácticamente el 100% en las células transducidas con el vector VL:sh7FANCA esta disminución sólo alcanzaba el 34% en el caso de células que expresaban el sh6FANCA. Aunque es cierto, que a nivel de ARNm, ambos vectores tuvieron la misma capacidad de inhibición esto no se corresponde directamente con el nivel de inhibición observado a nivel proteico, efecto que ha sido estudiado en varias publicaciones en las que se observa que no siempre existe una correlación entre la inhibición a nivel de transcripción y de traducción [580, 581]. Por ello, y a pesar de que en las células transducidas con el VL:sh6FANCA también se observaba una disminución de la proliferación celular, tal y como se muestran las células de AF, en posteriores estudios decidimos no utilizar este shARN para la inhibición de FANCA y utilizar el sh7FANCA, ya que éste último consiguió mimetizar el fenotipo de AF en las células en las que fue transducido.

En tercer lugar, como última evidencia a nivel molecular para corroborar la inhibición de la ruta de AF, se estudió la fracción de FANCD2 monoubiquitinado presente en el núcleo celular mediante WB, técnica utilizada actualmente como uno de los métodos de diagnóstico del fenotipo de células Fanconi [104, 582, 583]. Cuando se produce daño en el ADN, la monoubiquitinización de FANCD2 es necesaria para su movilización a la cromatina [584, 585] y su contribución a la reparación del daño generado [583]. Así pues y ya que la proteína FANCA es imprescindible para la monoubiquitinización de FANCD2, se evaluó la cantidad de proteína FANCD2 monoubiquitinizada en las células que expresaban los shARNs estudiados y se relacionó con la cantidad de proteína FANCD2 total presente en las células. De este modo, observamos que, en el caso de las células interferidas con el sh7FANCA, este ratio entre la proteína monoubiquitinizada y la proteína total mostraba una reducción del 70% respecto a las células transducidas con el vector VL: shcontrol. Esto indicaría que, al igual que ocurre con la proteína FANCA, la monoubiquitinización de FANCD2 se ve seriamente afectada en las células transducidas con VL:sh7FANCA, de forma similar a lo que ocurre en los pacientes de AF-A [583, 586-588].

Se debe mencionar que, a pesar de que en las células interferidas con el sh7FANCA apenas existía proteína FANCA, sí que se observó que había un pequeño porcentaje de proteína FANCD2 que estaba monoubiquitinizada. Esto podría explicarse por el hecho de que no toda la monoubiquitinización de la proteína FANCD2 depende de su interacción con el complejo “core” de la ruta de AF, sino que un pequeño porcentaje es debido a la actuación de otras ubiquitin ligasas independientes de la ruta de Fanconi [589, 590] o a BRCA1 [591], aunque estas proteínas no son esenciales para su ubiquitinización, como ocurriría en el caso de la ausencia de alguna de las proteínas del complejo core.

■ Inhibición de la ruta AF a nivel funcional.

Una vez que se comprobó la eficacia de los diferentes VL:shARNs para inhibir la expresión del gen FANCA a nivel molecular, el siguiente paso fue evaluar si la reducción de esta proteína tenía un

efecto sobre el correcto funcionamiento de la ruta de AF. De este modo, las células que expresasen estos shARNs deberían presentar un fenotipo igual al observado en las células de pacientes de AF [63, 592].

Recordemos que una característica de las células con fenotipo AF es la hipersensibilidad frente ciertos agentes químicos, como la MMC, que causan daños entrecruzantes en el ADN e impiden la resolución de las horquillas de replicación [593-595]. Esto se traduce en que las células expuestas a estos compuestos presentan un alto número de aberraciones cromosómicas, parámetro que es utilizado para el diagnóstico de la enfermedad en posibles pacientes [82, 586]. La aparición de estas anomalías cromosómicas, cuya acumulación desemboca en la muerte celular, es una consecuencia directa de la incapacidad que tienen las células de AF para reparar el daño producido en el ADN, debido al incorrecto funcionamiento de la ruta de AF. Esto ocurre porque, según se ha descrito, la ruta AF es necesaria para la generación de incisiones en el sitio dañado y la regulación de una serie de nucleasas implicadas en reparación del ADN [27], aunque es cierto que aún no se ha dilucidado totalmente el mecanismo de actuación de la ruta de AF en la reparación del ADN a pesar de que se ha estudiado en profundidad la implicación de las proteínas de AF en este proceso [62, 596-598].

Otra de las características distintivas de las células de AF es, como ya se ha mencionado, la ausencia de FANCD2 monoubiquitinizado en el núcleo y por lo tanto, su incapacidad para dirigirse a los focos de reparación. Así pues, además del análisis para estudiar la monoubiquitinización de FANCD2 a nivel molecular mediante WB, el saber si esta proteína se ha movilizado correctamente a los focos de reparación también se ha utilizado como herramienta de diagnóstico [589]. En las células con fenotipo sano, FANCD2 monoubiquitinizado colocaliza en los focos nucleares con proteínas involucradas en la reparación del ADN, tales como BRCA1, FANCD1/BRCA2, FANCD1/PALB2 y RAD51 [22, 587]. Sin embargo, en las células con fenotipo AF, FANCD2 no se monoubiquitina, no se moviliza a los sitios de daño y, por lo tanto, la reparación del daño en el ADN no se puede llevar a cabo.

Por lo tanto, hemos evaluado la inhibición de la ruta de AF en las células interferidas mediante el estudio de la movilización de FANCD2 a los sitios de reparación (focos nucleares de FANCD2), tanto en presencia como en ausencia de un agente inductor de daño del ADN, la MMC.

Con este análisis concluimos que tanto el VL:sh6FANCA como el VL:sh7FANCA inhiben FANCA a un nivel suficiente como para impedir la movilización de FANCD2 a los focos nucleares, ya que observamos que tras el daño con MMC, la presencia de focos FANCD2 era prácticamente nula en los núcleos de las células transducidas con los vectores VL:sh6FANCA y VL:sh7FANCA, lo cual no ocurría en las células control transducidas con el VL:shcontrol en donde la acumulación de focos de FANCD2 fue notable. Hay que destacar que, a pesar de observar una fracción de FANCD2 monoubiquitinada, esta proteína no fue movilizada a los sitios de reparación o no en la cantidad suficiente para reparar el daño inducido por la MMC. Este resultado es de gran importancia para demostrar que la inhibición de FANCA ejercida por los shARNs expresados en células humanas sanas consiguen reproducir el fenotipo de las células de AF a nivel funcional, impidiendo la movilización de FANCD2 a los núcleos tal y como ocurre en los pacientes. A pesar de ello, el sh6FANCA fue descartado para la consecución del proyecto, ya que aunque tras su utilización no se observó formación de focos FANCD2, es cierto que

existía un porcentaje de FANCD2 monoubiquitinizado que no consideramos aceptable para la generación del modelo de AF.

Así pues, tras todos los resultados expuestos, seleccionamos el sh7FANCA como el candidato ideal a shARN cuya expresión estable en células humanas utilizando VLs permiten reproducir el fenotipo *in vitro* de las células AF.

1.3. Inhibición de FANCA mediante VL:shARNs en células CD34⁺ procedentes de sangre de cordón.

Tras la confirmación de la validez de los VL:shARNs como una herramienta útil para reproducir el fenotipo de las células de pacientes de AF cuando se expresaban en células sanas, nos centramos en desarrollar nuestro objetivo principal, consistente en la generación de progenitores hematopoyéticos humanos con fenotipo AF mediante la inhibición de hFANCA en células madre y progenitores hematopoyéticos sanos (CMHs/CPHs) obtenidas de sangre de cordón umbilical de donantes sanos.

Al igual que hicimos anteriormente con los fibroblastos interferidos con shFANCA, se investigó si las CMHs/CPHs interferidas reproducían las características fenotípicas observadas en las células de los pacientes, comparando *in vitro* su fenotipo con el de las células de los pacientes de AF para comprobar que en un tipo celular diferente se seguían observando los mismos efectos producidos por el interferente.

Puesto que en las células de pacientes AF, la exposición con MMC induce daño en el ADN de forma que se activan las rutas de reparación celulares y, por lo tanto, la ruta de AF [82, 595], se analizó *in vitro* la sensibilidad a este compuesto de las CMHs/CPHs interferidas que generamos y se estudió el porcentaje de células que presentaban focos de FANCD2. De este modo verificamos que las células interferidas apenas formaban focos FANCD2, incluso en presencia de agentes inductores de daño en el ADN (MMC), obteniendo un efecto similar al presentado por las células de pacientes AF y diametralmente opuesto a lo que ocurría con las células control.

Por otro lado se puso de manifiesto que la falta total de focos de FANCD2 ocurría únicamente en las células que poseían una alta expresión del vector y que la sensibilidad a MMC *in vitro* también era más acusada en estas células. De este modo se puede inferir la existencia de una correlación entre el grado de expresión del VL:shFANCA y el nivel de inhibición, ya que sólo cuando existía un alto nivel de expresión del vector se lograba un nivel de interferencia que interrumpiera la ruta de AF. Esto está en concordancia con los artículos en los que se resalta la importancia de una expresión eficaz del shARN para poder lograr una reducción de la expresión efectiva [164, 599].

Para completar el estudio *in vitro* del fenotipo de las células CD34⁺ interferidas se evaluó el potencial de estas células para generar progenitores hematopoyéticos. Se ha descrito previamente que la MO de pacientes de AF muestran un número reducido de progenitores hematopoyéticos (PHs) en comparación con donantes sanos [600, 601], por lo que se analizó la capacidad de las CMHs interferidas de generar PHs *in vitro* utilizando un ensayo clonogénico para la generación de colonias hematopoyéticas y que se utiliza para estudiar la capacidad de las CMH de dar lugar a progenitores más o menos diferenciados.

Observamos que existía una ligera disminución en la capacidad de generación de PHs a partir de células interferidas en comparación con las células control. Sin embargo, el potencial de generación de los PHs secundarios a partir del replaqueo de las colonias primarias se vio seriamente comprometido, mostrándose una reducción del porcentaje de colonias hematopoyéticas de hasta el 90%, valores más parecidos a los observados en pacientes. A pesar de que en un momento inicial no parece no existir un efecto muy acusado sobre el potencial de los progenitores hematopoyéticos debido a la expresión de los interferentes y la reducción del gen *FANCA*, sí es cierto que cuando los progenitores se sometían a un estrés observamos que el potencial de generación de colonias disminuía drásticamente, alcanzando valores que sí que eran comparables con los obtenidos a partir de células de pacientes. Este fenómeno subraya la importancia que ejerce el estrés inducido por el cultivo *in vitro* en las células interferidas, que reproduce los efectos que tendría el estrés *in vivo* sobre las células de los pacientes a lo largo de su enfermedad, ya que a medida que avanza la patología el número de CMHs disminuye y también su potencial clonogénico. Esto induce a pensar que para observar un fenotipo más acusado de AF en nuestras células interferidas y más parecido al mostrado por los pacientes es necesario, no solamente la disminución de la expresión del gen, sino que estas células estén sometidas a algún tipo de estrés similar al que pueden estar soportando los progenitores a lo largo de la vida de los pacientes.

La sensibilidad a la exposición a agentes inductores de daño en el ADN es, como se ha mencionado, otra de las características que ayudan a distinguir las células de pacientes de AF de las células de donantes sanos [534, 595, 602-604]. Así pues, en presencia de MMC, se observó no sólo la ausencia de focos de FANCD2, como se mencionó anteriormente, sino la existencia de una reducción de la supervivencia de colonias hematopoyéticas generadas a partir de CMHs interferidas, al igual que ocurre con los progenitores hematopoyéticos de MO de pacientes de AF [605]. Por otro lado, el tratamiento con diepoxibutano (DEB) de las células interferidas generadas incrementó notablemente el porcentaje de células aberrantes en comparación con las células control, emulando lo que ocurre en las células de AF, donde la utilización de este agente químico induce la aparición de aberraciones cromosómicas, tales como roturas cromosómicas o cromosomas radiales [534], por lo que este parámetro es utilizado como sistema de diagnóstico [534].

Otra característica descrita en las células de pacientes de AF es su sensibilidad a citoquinas inflamatorias como el TNF α , observándose que la exposición de progenitores hematopoyéticos AF a esta citoquina conduce a una pérdida de éstos por apoptosis [606]. Nuestros resultados mostraron, que del mismo modo que ocurre en células de pacientes de AF, en presencia de esta citoquina, las CMHs/CPHs interferidas muestran una proliferación disminuida y un descenso en el porcentaje de supervivencia de las colonias generadas a partir de los PHs interferidos. Es importante reseñar que, ya en ausencia de esta citoquina, se observaba una disminución basal tanto en el número de células interferidas, como en la supervivencia de las colonias hematopoyéticas generadas a partir de éstas respecto a las células control.

Finalmente y para evaluar que nuestras células CD34⁺ interferidas reproducían todos las características descritas en las células AF, estudiamos si existía una parada de ciclo en fase G2/M en nuestras células cuando sobre estas se realizaba un daño en el ADN con MMC. Esta parada de ciclo

ocurre de forma característica en las células AF como consecuencia de la incapacidad que tienen las células AF de reparar el daño producido por agentes entrecruzantes del ADN debido a la acumulación de horquillas de reparación bloqueadas [72, 83]. A pesar de que hasta el momento, las células interferidas mimetizaban todas las características fenotípicas observadas en las células de pacientes, éstas no reprodujeron la parada de ciclo en fase G2/M típicamente mostrada por las células de AF tras ser expuestas a MMC [607]. Aunque en un primer momento este resultado parece indicar que nuestro modelo no es capaz de reproducir esta característica de las células de AF, es importante resaltar que esta parada no ha sido nunca observada en CMHs humanas de pacientes. De hecho, el único estudio existente en el que se interfiere uno de los genes de la ruta AF, *FANCD2*, en células CD34⁺ tampoco se reprodujo la parada en G2/M [608]. Para explicar este fenómeno se plantean varias hipótesis:

- Una de las posibles explicaciones podría ser que las células presentan un fenotipo más parecido al de un paciente atenuado [79]. Recordemos que estos pacientes, en los que no se produce la reversión de la mutación que origina la enfermedad, no muestran alguna de las características fenotípicas que describen a un paciente de AF como son la parada del ciclo celular en G2/M tras su exposición a agentes entrecruzantes del ADN [79].
- Otra posibilidad nacería de la hipótesis de que la observación de la parada de ciclo en células de pacientes AF ocurre no únicamente como consecuencia de la presencia de la mutación que causa la patología, sino que también es necesario que se produzca un cúmulo de situaciones de estrés en el nicho hematopoyético del paciente en un tiempo y situaciones determinadas, aún desconocidas. Esto haría que la interrupción de un gen de la ruta de AF mediante el uso de interferentes no sea suficiente para inducir la parada de ciclo y que sea imposible su reproducción *in vitro*, al menos de momento, ya que no se pueden mantener las células CMHs interferidas durante un tiempo prolongado en cultivo y por tanto, no se pueden reproducir las condiciones existentes en los pacientes. El relativamente corto periodo de tiempo en el que es posible mantener las CMHs interferidas en cultivo puede ser el causante de que, en el momento de análisis del ciclo, no existan el número suficiente de horquillas de replicación bloqueadas para que se acumulen células en G2/M, a pesar de que el daño generado sí es suficiente para la observación del resto de características fenotípicas.
- Finalmente, otra posible explicación es que las células, en vez de pararse en esta fase, eludan este paso y entre directamente en apoptosis.

Para confirmar esto último, se estudió el nivel de apoptosis en las células interferidas en comparación con las células control. En primer lugar se analizó la expresión de γ H2AX para estudiar el incremento de roturas de doble cadena presentes en las células CD34⁺ interferidas para así estudiar el efecto genotóxico de la MMC en estas células [518, 609, 610]. Se pudo observar que existía un aumento de las DSBs en las células interferidas, aunque este daño no se viera reflejado en la parada de ciclo. Además, el nivel de muerte celular (acumulación de células en fase sub-G₁) estaba incrementado también en las células interferidas respecto a las células control, tanto en presencia como ausencia de MMC. Todos estos resultados confirman la existencia de una alteración en el ciclo celular de las células interferidas y no en las células control, aunque no se llegue a reproducir la

parada en G2/M. Estos resultados están en concordancia con los resultados publicados por Soulier y col. [608] en los que observaron que el estrés celular en las células de AF desencadenaba una parada del ciclo en G0/G1 y acumulación de γ H2AX, pero no parada en G2/M. Además hay que resaltar que el incremento de apoptosis es también una característica observada en las células de pacientes AF [606, 611-613].

De forma resumida podemos concluir que gracias a la interferencia del gen *FANCA* en células CD34⁺ se consigue emular la mayoría de las características observadas en las células procedentes de pacientes de AF como son la sensibilidad a agentes entrecruzantes del ADN, una formación deficiente de focos de FANCD2, el aumento de la inestabilidad cromosómica en presencia de MMC, la sensibilidad a citoquinas pro-inflamatorias como el TNF α , una apoptosis aumentada y una clara reducción de PHs, que se ve incrementada cuanto más primitivos son éstos, lo que resalta la necesidad de un estrés para inducir un fenotipo similar al que sufren los PHs de pacientes de AF, sometidos a múltiples eventos de estrés a lo largo de su vida.

1.4. Desarrollo de un modelo humanizado de AF: Trasplante de células CD34⁺ interferidas en ratones inmunodeficientes.

Una vez que dispusimos de células CD34⁺ interferidas para el gen *FANCA* y comprobamos *in vitro* que estas células reproducían las características mostradas por las células de pacientes de AF, llevamos a cabo el desarrollo de nuestro principal objetivo en esta primera parte del trabajo, que consistió en la realización de un modelo humanizado de AF *in vivo* generado mediante el trasplante de progenitores hematopoyéticos interferidos para el gen *hFANCA*. Este modelo nos permitió, en primer lugar, analizar el comportamiento de estas células interferidas *in vivo*.

Es importante señalar y recordar el hecho de que, hasta el momento, no existe ningún ratón deficiente en alguno de los genes de la ruta AF que desarrolle espontáneamente fallo en la médula ósea observado en pacientes [614, 615] y, únicamente cuando se eliminan dos genes, en el modelo modelo de ratón *Fancd2/Aldh*, los ratones desarrollan anemia aplásica en individuos mayores [139]. De ahí la importancia de desarrollar un modelo humanizado de ratón mediante el trasplante de CMHs de pacientes de AF. A pesar de que esto sería una solución al problema, hasta la fecha no se ha conseguido reconstituir *in vivo* ratones inmunodeficientes con CMH/PHs procedentes de AF de forma reproducible, existiendo sólo un trabajo en el que lo han llevado a cabo [616]. Por ello, pensamos que el trasplante de las células con fenotipo de AF serían una alternativa plausible.

Así pues, en primer lugar se analizó la capacidad de injerto de las células interferidas en los ratones AF. Para ello, se trasplantaron CMHs/CPHs que expresan el *shFANCA* o el *shcontrol* en ratones inmunodeficientes NOD/SCID [617] y se estudió la presencia de injerto humano, mediante punción medular, cada 30 días durante 3 meses después de la realización del trasplante.

El primer dato relevante fue que se pudo observar que tanto las células interferidas como las que no lo están podían injertar en ratones inmunodeficientes NOD/SCID a 30 días tras el trasplante, al contrario de lo que ocurre cuando se trasplantan células de pacientes, que no injertan en ratones. Una posible explicación por la que no se haya conseguido injertar células de pacientes AF y sí las células que hemos generado con fenotipo AF, podría ser, en primer lugar el que la cantidad de

médula ósea disponible en excedentes de aspirados de MO utilizados para el seguimiento de los pacientes no suele ser superior a 1-2 ml y sólo menos del 0,5% de la población hematopoyética son CD34⁺ [618], por lo que resultaría muy difícil trasplantar 5x10⁵ células CD34⁺ como hemos venido haciendo con las CD34⁺ interferidas. En segundo lugar, las células obtenidas en pacientes, al haber estado sometidas durante largo tiempo a diferentes tipos de estrés, pueden tener acumulado una cantidad de daño tal que aún las incapacite más para injertar en los ratones. Independientemente del motivo, el injerto de PHs con fenotipo de AF nos permitió estudiar el comportamiento *in vivo* de estas células a lo largo del tiempo, algo que no se había podido realizar hasta el momento utilizando las células de los pacientes AF.

Una vez superado este hito, el análisis del comportamiento *in vivo* de las células con fenotipo de AF reflejó una disminución del porcentaje de las células interferidas a lo largo del tiempo, efecto contrario al mostrado por las células control cuyo porcentaje aumentó a lo largo del estudio. Este resultado concuerda con el fallo de MO observado en los pacientes y resalta, junto con la acusada disminución de la generación de colonias hematopoyéticas secundarias *in vitro*, que para observar un fenotipo de la patología más acusado es necesaria la inducción de un estrés proliferativo en las células interferidas como el sufrido por la población *in vivo*.

Adicionalmente se comprobó que estas células mantenían una interferencia estable del gen *hFANCA* a lo largo del tiempo. Esto se verificó gracias a que los PHs obtenidos de ratones trasplantados con células interferidas tenían una capacidad de generación de colonias hematopoyéticas mucho menor que las células control, ya en estado basal. Esto, de nuevo, es consistente con nuestra teoría de que la presencia de un estrés inducido por el tiempo durante el que las células están injertadas en el ratón, es necesario para observar un fenotipo de AF más acentuado.

La preservación de la interferencia de *FANCA* en las células interferidas a lo largo del tiempo, también se ratificó tras la observación de que las células hematopoyéticas obtenidas del ratón trasplantado con PHs interferidos, eran sensibles a MMC. Además, la supervivencia de colonias interferidas estaba reducida respecto a las células control. Por otro lado, el resultado obtenido por qPCR mostró una inhibición estable de la expresión *FANCA*. De este modo, se confirmó que el nivel de interferencia del gen *FANCA* se mantenía a lo largo del tiempo y que en aquellos ratones en los que todavía se observaba injerto no fue debido a la existencia de una selección de células no interferidas por presión del cultivo. Es importante resaltar que ya a nivel basal sin tratamiento con MMC se observó que las células procedentes de ratones trasplantados con células interferidas tenían un potencial de diferenciación hematopoyética mucho menor que las procedentes de ratones trasplantados con células control.

Todos estos resultados nos confirmaron que en el modelo de ratón humanizado el injerto de las células interferidas disminuyó progresivamente a lo largo del tiempo, emulando el fallo de MO observado en pacientes. Consideramos, por tanto, que éste es un modelo válido para el estudio de diferentes aproximaciones terapéuticas que permitan la investigación en la eficacia de nuevos tratamientos del fallo de MO característica de la AF.

1.5. Estudio de nuevas aproximaciones terapéuticas utilizando el modelo de la enfermedad generado: Eficacia de la Terapia Génica.

El desarrollo *in vivo* de un modelo humanizado de AF, como se ha mencionado, nos permite entre otros aspectos, el poder validar el efecto de terapias avanzadas para pacientes de AF, tales como la terapia génica.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un vector lentiviral PGK.FANCA.WPRE* [6] que ha sido aprobado como medicamento huérfano por la Comisión Europea para el tratamiento de pacientes AF-A [501]. Aunque los estudios realizados demuestran la eficacia de los vectores lentivirales para corregir el fenotipo de los progenitores hematopoyéticos humanos *in vitro* [6, 618], no se ha podido demostrar *in vivo* la corrección del problema hematopoyético en células humanas a largo plazo, por lo que nuestro modelo proporcionaría un marco excelente para su estudio.

Siguiendo básicamente el protocolo de transducción que se llevará a cabo en pacientes, las CMH/CPHs interferidas se transdujeron *in vitro* con el vector terapéutico (VL:PGK.FANCA.Wpre*) y posteriormente fueron trasplantadas en el ratón para poder analizar su comportamiento *in vivo*.

El problema que potencialmente podría surgir en nuestra aproximación es que el ARN de interferencia (shFANCA) utilizado para generar PHs con fenotipo de AF, al unirse con al ARNm procedente del ADN codificante del gen, no sólo podría inhibir la expresión del gen FANCA endógeno, sino también la del gen ectópico introducido en la célula a través del vector terapéutico. Para evitar este problema, generamos a partir del anterior vector mencionado uno nuevo cuya única diferencia radicara en la introducción de tres mutaciones silentes o sinónimas en la secuencia del gen FANCA del vector terapéutico [577, 581]. Estas mutaciones alteran la secuencia nucleotídica del gen impidiendo, por tanto, que el shARN reconociera el ARNm y lo degradara. Por otra parte, al tratarse de mutaciones sinónimas o silentes, no se modificaría la secuencia aminoacídica de la proteína FANCA, de modo que ésta, teóricamente, sería funcionalmente idéntica a la endógena.

Tras evaluar *in vitro* que la capacidad de revertir la sensibilidad a MMC en LCLs de pacientes de los vectores en los que se habían realizado las mutaciones silentes era igual a la que tenía el vector terapéutico original, se procedió a validar su eficacia como herramienta para la terapia génica en progenitores hematopoyéticos interferidos. Al igual que ocurría en las LCLs de AF-A, el vector terapéutico mutado consiguió revertir la sensibilidad a MMC de PHs interferidos al mismo nivel que lo hacía el vector clínico original.

Una vez comprobada la funcionalidad de dicho vector *in vitro*, se trasplantaron las CMHs/CPHs interferidas y posteriormente corregidas en ratones inmunodeficientes para estudiar el comportamiento de estas células *in vivo*.

Se pudo observar que, mientras que la tendencia del injerto de las células interferidas era disminuir a lo largo del tiempo, las células interferidas y corregidas, ya fuera con el vector terapéutico sin mutar o mutado, experimentaban un incremento de la capacidad de injerto. Hay que resaltar que este experimento se realizó utilizando tanto células seleccionadas previamente, como sin seleccionar.

Así pues, el injerto de una población celular sin seleccionar puso de manifiesto la existencia de una competición entre células sanas e interferidas, de modo que mientras que las células interferidas disminuían a lo largo del tiempo, las sanas o las interferidas y posteriormente corregidas

aumentaron su porcentaje. Esto no fue apreciable del mismo modo cuando trasplantamos una población homogénea de células seleccionadas, donde no existía esta competición. Por ello, pudimos observar que el perfil de incremento del porcentaje de células interferidas y corregidas a diferentes tiempos fue más acusado cuando utilizamos células sin seleccionar que cuando trasplantamos células seleccionadas.

Estos datos están en concordancia con el conocimiento que tenemos de que la corrección de las células AF confiere a las células ventaja proliferativa frente a aquellas que no lo están, al igual que se ha observado cuando, de forma natural y espontánea, revierte la mutación causante de la patología en aquellos pacientes que presentan mosaicismo somático [77, 78].

Todos estos resultados confirmaron que era posible utilizar este modelo humanizado de ratón para evaluar el efecto de la terapia génica en AF y que esta terapia era válida para recuperar la hematopoyesis *in vivo* en células humanas con fenotipo de AF.

Es importante resaltar que el vector clínico consiguió un nivel de reversión de la sensibilidad a MMC muy similar al obtenido con el vector que contenía mutaciones silentes y también al de las células control; mostrando, además, un comportamiento *in vivo* similar al de estos otros dos grupos de estudio, a pesar de que su secuencia podría ser reconocida por el shFANCA. Esto puede explicarse por el hecho de que el shFANCA generado en la célula no es suficiente para silenciar a la vez el gen endógeno y el introducido ectópicamente. Esto podría ocurrir por varios motivos, uno de ellos podría ser que el shARN quizás se esté uniendo más eficientemente al gen endógeno que al ectópico, o también porque posiblemente se esté introduciendo más de una copia del gen terapéutico, a pesar de utilizar una MOI=1, y el shARN no tenga capacidad para inhibirlo.

Por ello, puesto que los resultados con el vector terapéutico mutado y sin mutar fueron similares, se decidió que en el futuro se utilizaría la versión original del vector, puesto que es el que está aprobado para su utilización en el ensayo clínico.

Finalmente para confirmar la corrección de los progenitores hematopoyéticos a largo plazo se hicieron ensayos clonogénicos *in vitro* en presencia de MMC de los progenitores hematopoyéticos obtenidos de los diferentes grupos de ratones trasplantados. Estos ensayos sirvieron para confirmar que, en presencia de MMC, las células con fenotipo de AF incrementaban su supervivencia tras la corrección a niveles similares a la que tenían las células control tal y como se había observado previamente *in vitro* [6].

Tomando en conjunto todos los datos obtenidos durante la realización de este proyecto, es posible concluir que se ha generado un modelo animal humanizado de ratón mediante el uso de VL:shARNs que inhiben la expresión de FANCA en el que se ha podido validar la terapia génica convencional como terapia para AF. Este modelo también puede ser utilizado para estudiar el efecto de las diferentes citoquinas y otros factores sobre las células de Fanconi y para analizar el efecto múltiples tratamientos.

Enlazando además con la segunda parte del trabajo, este modelo, en el que se reproduce el problema hematológico que tiene lugar en los pacientes de AF, nos será útil en el futuro para estudiar *in vivo* el comportamiento de células hematopoyéticas generadas por nosotros en el

laboratorio a partir de iPSCs derivadas de fibroblastos de pacientes de AF corregidos previamente por RH, en comparación con las células hematopoyéticas interferidas con fenotipo de AF.

2. GENERACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DERIVADOS DE iPSCs A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CORREGIDOS MEDIANTE TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA EN UN SITIO SEGURO DEL GENOMA.

Como indica el título de esta tesis nuestro trabajo se ha centrado en la búsqueda de nuevas aproximaciones para el tratamiento de AF. En la primera parte de este trabajo se ha desarrollado un modelo animal humanizado que nos ha permitido validar la eficacia de la terapia génica convencional. Sin embargo, los nuevos avances que han ido apareciendo en los últimos años, tanto en el campo de la terapia génica como celular, hicieron que explorásemos nuevas vías, complementarias a la terapia génica convencional, para buscar opciones terapéuticas más seguras para el futuro tratamiento de esta enfermedad.

En esta dirección nos planteamos el objetivo de generar progenitores hematopoyéticos corregidos para la patología a partir de fibroblastos de AF, sirviéndonos para ello de la tecnología basada en el uso de nucleasas para la introducción específica de un transgén en un sitio seguro del genoma [7, 373, 374] y de la recién desarrollada metodología para generar células pluripotentes indiferenciadas (iPSCs) a partir de células somáticas diferenciadas [9, 427].

Antes de continuar con el resto de la discusión es importante explicar el porqué en nuestro caso se optó por la inserción del gen terapéutico en un sitio seguro del genoma en lugar de específicamente en el locus donde se encontraba la mutación.

Aunque ambas estrategias son adecuadas, la utilización de una u otra presenta ventajas e inconvenientes dependiendo del tipo de aproximación que se quiera realizar y la patología que se quiere tratar. La principal ventaja que tiene para nosotros la utilización de un sitio seguro como diana para llevar a cabo la corrección por recombinación homóloga es que esta aproximación podría ser aplicable a cualquier grupo de pacientes de AF independientemente de la localización de la mutación causante de la patología, tan sólo sustituyendo el gen defectuoso, en cada caso, en el vector donador. La importancia que tiene esto en la enfermedad de AF es que esta patología está causada por alteraciones genéticas que afectan a 16 genes diferentes y, además, incluso dentro de un mismo grupo de complementación las mutaciones responsables de la patología son muy diversas [33, 82]. Así, en el gen *FANCA* podemos encontrar que se han descrito más de 450 mutaciones en este gen que pueden causar AF y que incluyen desde mutaciones puntuales a inserciones o deleciones [619]. Por ello, la inserción del ADNc del gen *FANCA* en un sitio seguro del genoma en lugar de la sustitución específica de la región mutada sería una aproximación válida para todos los pacientes con alteraciones en ese gen. Otra ventaja que presenta esta aproximación es que existe menos peligro de transactivar genes próximos, tal y como se ha validado en diferentes estudios para la inserción de genes en el gen sitio seguro que nosotros hemos utilizado en este trabajo [7]. Sin embargo, la principal desventaja consiste en que no se realiza una reparación verdadera del gen defectuoso, sino que existe una complementación de dicho gen y también que se pierde la regulación endógena de

dicho gen, aunque esto podría ser solucionado incluyendo el promotor fisiológico del gen terapéutico.

La elección del gen *AAVS1* para llevar a cabo nuestro proyecto se basó en que éste cumple los criterios establecidos que definen un locus como un sitio seguro en el genoma. Así pues, permite una expresión estable de los transgenes integrados en él en diferentes tipos celulares [7]; no se han observado efectos adversos debidos a la interrupción y expresión del transgén [7, 289, 373, 412], y no se observa alteración transcripcional ni en el locus en el que se ha generado la integración, ni en los genes adyacentes o secuencias codificantes reguladoras [7].

Además, para este sitio seguro existen unos ZFNs diseñados por Sangamo® cuya eficacia, eficiencia y ausencia de sitios de corte inespecíficos (*off-targets*) han sido descritos en diferentes trabajos [7, 284, 289, 373].

Por todo ello, decidimos realizar la corrección del fenotipo de AF-A utilizando una estrategia de terapia génica utilizando ZFNs para el sitio seguro *AAVS1* y mediada por recombinación homóloga directa (RHD).

2.1. Evaluación de la posibilidad de llevar a cabo protocolos de recombinación homóloga en células de AF.

Como se mencionó en la introducción, la utilización de diversas nucleasas con el fin de modificar de forma específica el genoma para la corrección de distintas patologías es una técnica que se está utilizando cada vez más para su aplicación en el tratamiento de enfermedades monogénicas [312, 345, 346, 369, 620]. Esto es lo que se ha denominado como terapia génica dirigida y aunque a primera vista parece una estrategia idónea para evitar los efectos colaterales asociados con la terapia génica convencional [621], su aplicación conlleva diversos impedimentos. Uno de ellos y que nos afecta directamente en nuestro trabajo, es que para introducir de forma específica un ADN exógeno en el genoma es necesario que la maquinaria de recombinación homóloga funcione correctamente. En el caso de la AF, como se detalló anteriormente, existe una controversia acerca de cuál es el papel de las diferentes proteínas en la RH (excepto en el caso de *BRCA2*), de modo que no se conoce con exactitud si su ausencia produce una alteración de este mecanismo de reparación, aunque parece claro que, mientras que la ausencia de *BRCA2* tiene un efecto determinante en la RH, la deficiencia de genes del complejo “core” como lo es *FANCA*, tiene efectos mucho más leves, en caso de que existan [537, 538, 622, 623].

Por ello, antes de comenzar con la corrección de fibroblastos de pacientes de AF mediante esta técnica, se evaluó si era posible realizar protocolos de recombinación homóloga en células de AF. Para ello se utilizó un sistema basado en la introducción de un casete que contenga el gen marcador *eGFP* de forma específica en el sitio seguro *AAVS1*.

La comparación de la expresión del gen *eGFP* en tres líneas diferentes de LCLs de pacientes corregidas y sin corregir previamente para el defecto de la ruta de AF, nos reveló que las diferencias observadas entre las líneas no eran debidas al defecto genético, sino que parecían ser dependientes del paciente del que procedían. Esto demuestra por primera vez que era posible llevar a cabo

protocolos de editado génico para corregir nuestras células, ya que el defecto de *FANCA* no impedía la resolución del daño inducido por las ZFNs nucleasas.

2.2. Terapia génica dirigida en fibroblastos de pacientes de AF-A.

Puesto que la introducción de un gen en un sitio determinado del genoma había sido posible en células de pacientes de AF mediante el uso de nucleasas, el siguiente paso evidente consistió en corregir estas células con un vector que contuviera el gen *FANCA*. Este vector, además de dicho gen, contenía los dos brazos de homología del sitio *AAVS1* y el gen marcador *eGFP*, cuya expresión sólo tenía lugar, con una elevada probabilidad, cuando el vector se integraba en el sitio adecuado en el genoma o con una probabilidad ínfimamente más reducida, si lo hiciera justo a continuación de un promotor génico. Para conseguir la expresión específica del gen *eGFP* únicamente tras su inserción en el sitio deseado, no se dirigió la expresión de este gen utilizando ningún promotor ectópico, sino que, sólo si éste se introducía en el locus *AAVS1*, su expresión tendría lugar bajo el promotor del gen *PPP1R12C*. Esta estrategia nos permitió observar la inserción del casete de RH en los fibroblastos, una vez que estos habían sido cotransfectados con el vector donador y con los ZFNs. Además, la selección de células verdes mediante un separador celular nos permitió tener una población en la que un alto porcentaje de las células tendrían el casete de RH introducido en el sitio deseado.

Una vez que establecimos las condiciones óptimas de transducción llevamos a cabo la corrección de fibroblastos de cuatro pacientes y los resultados mostraron que únicamente cuando se cotransducían las células con el vector donador y el AdV-ZFNs se observaba expresión de *eGFP*, lo cual parecía indicar que no existía una integración eficaz del casete (con expresión de *eGFP*) en aquellas células que no habían sido transducidas con los ZFNs. Estos resultados confirmaron que era posible llevar a cabo inserción dirigida de un gen mediante RH en células de AF utilizando ZFNs, como ya habíamos deducido de los experimentos con LCLs, y además que esto ocurría con unas eficacias (0,2%-1,10%) que estaban en el rango de las obtenidas en otros trabajos en los que se habían llevado a cabo estrategias similares de corrección [7, 373-376, 378]. Estos resultados, además, confirman una vez más que la RH no está afectada de forma notable en AF-A.

Otro dato relevante que se puede extraer de estos experimentos es que el porcentaje de células *eGFP* positivas y, por lo tanto, corregidas mediante edición génica fue aumentado a lo largo del tiempo en ausencia de selección hasta alcanzar valores que oscilaron entre el 5,50% y el 13,40%. Es decir, se observó un incremento de la población verde de más de diez veces. La explicación a este fenómeno se apoya en el hecho de que la corrección del defecto genético confiere una ventaja proliferativa, en el caso de la AF, a estas células frente a aquéllas que no están corregidas. Este efecto se observa, de forma natural, en pacientes con mosaicismo somático, fenómeno originado por la reversión espontánea de la mutación causante de la patología [77, 78, 132, 624] o, de forma artificial, cuando se lleva a cabo la complementación del gen deficiente con vectores integrativos [625]. Esta ventaja proliferativa que se manifiesta a lo largo del tiempo, tras los experimentos de editado génico, constituye la primera evidencia de que hay corrección de la patología.

■ Incremento de la eficiencia de Recombinación Homóloga en presencia de la Telomerasa.

Uno de los mayores problemas que conlleva el trabajar con células de pacientes de AF es que, a pesar de ser mantenidas en condiciones de cultivo de hipoxia (5% O₂) [89], tienden a entrar en senescencia prematuramente [539, 579, 626, 627], lo que dificulta su crecimiento y su manipulación *in vitro*. Debido a esto, se buscaron alternativas que evitaran este proceso y nos permitieran mantener las células de AF-A el tiempo necesario en cultivo para llevar a cabo toda la manipulación necesaria para corregir las células mediante edición génica. En nuestro caso, la estrategia a seguir fue la inmortalización reversible de estas células utilizando un vector lentiviral que expresa la subunidad catalítica hTERT de la telomerasa humana [505]. Este vector contiene secuencias loxP que permitirían su escisión con la proteína Cre Recombinasa y un gen de selección negativa que expresa la proteína timidina quinasa de modo que, tras la adición de ganciclovir, las células en las que no se haya escindido este casete de expresión morirían.

Una vez que se inmortalizaron los fibroblastos, estos se corrigieron mediante terapia génica dirigida. Pudimos observar que la presencia del vector que expresaba la telomerasa aumentaba la eficiencia de RH en células de tres pacientes de AF-A diferentes hasta más de cinco veces respecto a aquellas células que no expresaban dicho vector. Además, al igual que ocurría con los fibroblastos sin inmortalizar, a lo largo del tiempo, los fibroblastos corregidos mostraban una ventaja proliferativa que hizo que en uno de los pacientes, AF-52, se alcanzaran porcentajes de hasta el 40% de células eGFP positivas.

■ Reparación de la ruta de AF tras el editado génico.

Puesto que en este paciente es donde se obtuvieron mejores resultados, en cuanto a porcentaje de células eGFP positivas se refiere, fue el que elegimos para la continuación de nuestro proyecto.

Antes de realizar la reprogramación a iPSCs, paso siguiente a seguir en nuestro trabajo, se comprobó en una población seleccionada para células eGFP positivas que la integración había tenido lugar en el sitio adecuado, AAVS1, en los fibroblastos de este paciente mediante una PCR específica para ese locus. También se verificó que a nivel funcional las células estaban corregidas, ya que aunque la proliferación aumentada era una evidencia de que esto posiblemente era así, esto se confirmó mediante la realización de dos pruebas diferentes:

- Un análisis de la presencia de focos nucleares de FANCD2, cuyo resultado fue que las células corregidas por edición génica presentaban un porcentaje de células con la ruta de AF restaurada similar a las células control, tanto en ausencia como en presencia de MMC, y en contraste con lo que ocurría con las células sin corregir cuya ausencia de focos FANCD2 evidenciaban ser típicamente células con fenotipo de AF [82, 595].
- Un estudio de la estabilidad cromosómica de las células corregidas tras su exposición a un agente entrecruzante del ADN, el DEB [534]. Pudimos observar que la integración del gen FANCA en el genoma disminuía notablemente la aparición de aberraciones cromosómicas típicamente observadas en las células de pacientes de AF-A [82, 628]].

Estos resultados mostraron que por primera vez había sido posible corregir fenotípicamente células de pacientes de AF utilizando técnicas de terapia génica dirigida, mediante la introducción del gen *FANCA* en el sitio seguro *AAVS1*.

2.3. Generación de iPSCs a partir de fibroblastos de AF-A corregidos mediante edición génica.

Tras verificar que los fibroblastos podían ser corregidos por técnicas de recombinación homóloga, se generaron células indiferenciadas pluripotentes a partir de ellos mediante su reprogramación con un vector lentiviral escindible poliestrónico que contenía los cuatro genes de reprogramación utilizados por Yamanaka [9, 135]. A pesar de que, como vimos en el apartado 9.1 de la introducción de esta tesis, existen múltiples métodos para la generación de iPSC (ver tabla 7), nosotros elegimos un sistema viral basado en un lentivirus que podía ser escindido posteriormente y cuya correcta funcionalidad había sido previamente reportada [10, 506]. Para facilitar la posterior escisión del vector y aumentar la seguridad del proceso, la transducción se llevó a cabo con una única copia del lentivirus por célula, la cual resultó ser una MOI suficiente para lograr la desdiferenciación celular.

Es importante matizar que para este trabajo se optó por realizar la desdiferenciación o reprogramación celular después de llevar a cabo la corrección por edición génica de la patología, a pesar de que la mayoría de las aproximaciones realizadas hasta ahora en otras enfermedades optan por realizar primero la reprogramación y posteriormente la corrección [361]. Esto fue así porque en el caso de la AF es preferible seguir la estrategia mencionada para aumentar la eficacia de generación de iPSCs y mantener la máxima estabilidad genómica, ya que la reprogramación antes de realizar la complementación del gen deficiente es muy ineficaz [136, 539], además de que las células son más senescentes y acumulan daño debido al incremento de DSBs [539].

Incremento de la Reprogramación Celular en presencia de la Telomerasa.

Puesto que en publicaciones anteriores se había llegado a la conclusión de que la inmortalización de las células somáticas con el antígeno SV40T ó del antígeno SV40T junto con *hTERT* disminuía la apoptosis de las células e incrementaba la frecuencia de formación de colonias de iPSCs [424, 425], en nuestro caso particular, quisimos comprobar si la presencia únicamente de la telomerasa aumentaba la eficacia de generación de las iPSCs.

Nuestros resultados mostraron que la transducción con el vector que expresaba la telomerasa incrementaba notablemente la eficiencia de reprogramación en fibroblastos AF-A corregidos y además que estas colonias generadas permanecían a lo largo del tiempo con una frecuencia más elevada que en el caso de las células que no expresaban *hTERT*, es decir aumentaba la frecuencia de colonias completamente reprogramadas.

Por otro lado, quisimos comprobar si la expresión de la telomerasa era suficiente para reprogramar los fibroblastos de AF, o si era necesaria la restauración previa de la ruta AF mediante la presencia de *FANCA*. Nuestros resultados mostraron que, como cabía esperar, sí que era necesario corregir el defecto genético para conseguir unos resultados óptimos de reprogramación y que la

expresión de la *hTERT* por sí sola, no era suficiente, para que se produjera la reprogramación en células sin corregir.

■ Generación de iPSCs-AF editadas genéticamente.

Una vez comprobado esto, por tanto, se generaron iPSCs a partir de fibroblastos de un paciente de AF-A que había sido corregido previamente para la patología y transducido con el vector que expresaba la subunidad catalítica de la telomerasa. En doce de los sesenta clones se llevaron a cabo los estudios moleculares y funcionales que verificaron la correcta corrección de la patología y el estado pluripotente de las células.

De este modo se constató que todos los clones, excepto uno, tenían una copia del casete de RH [510] y que esta copia estaba introducida en el locus *AAVS1*, lo cual confirmó la ya descrita previamente alta especificidad de los ZFN diseñados para este locus [7, 289]. Por otro lado, hay que resaltar que, a pesar de que se pudo generar un clon de iPSCs a partir de un fibroblasto sin corregir, este clon desapareció a los pocos pases en cultivo. Esto confirma que, aunque en un principio es posible generar iPSCs a partir de células de pacientes de AF-A que no están complementadas para el gen *FANCA* con una eficiencia mucho menor que si estuviesen corregidas [539], estas iPSCs desaparecen a lo largo del tiempo. Esto puede ser debido a que las células sin corregir presentan una inestabilidad genética elevada, que sumado a la inestabilidad que se puede inducir durante el proceso de reprogramación hace que estos clones sean inviables.

Teniendo en mente la futura aplicación clínica de esta aproximación, se escogieron para su posterior análisis y diferenciación sólo aquellos clones con mejor morfología y con el menor número de copias del vector de reprogramación, para facilitar su posible posterior escisión y con el fin de tener unos clones más seguros. Así en tres de los clones se analizó la posible integración del casete de RH en otros sitios del genoma además de en el sitio diana. Este análisis confirmó que, como ya indicaban los resultados de Q-PCR y PCR, existía una única integración del casete de RH en el sitio deseado y además que no se había producido integración al azar en el resto del genoma; es decir todos los clones seleccionados tenían una única integración del casete de RH en heterocigosis en el locus *AAVS1*.

■ Los clones de iPSCs generados son pluripotentes.

Además de evaluar que en los clones seleccionados el proceso de corrección por recombinación homóloga había ocurrido adecuadamente a nivel molecular, se realizó un análisis exhaustivo del estado pluripotente e indiferenciado de los clones de iPSCs.

En primer lugar, se detectaron con éxito, mediante técnicas inmunohistoquímicas, marcadores de pluripotencia (AP, OCT3/4, NANOG, TRA-1-60 y SSEA-4) que se expresan en células madre [9, 543, 544].

Se ha estudiado que durante el proceso de reprogramación ocurren una serie de acontecimientos indispensables para una completa desdiferenciación celular, tales como la activación de los genes endógenos de pluripotencia de forma escalonada en el tiempo y el cambio de estado de metilación de distintos genes [629]. En nuestros clones se observó, por Q-PCR, que la expresión de los genes de pluripotencia endógenos (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC* y *REX*) se

había activado durante el proceso de reprogramación y que los niveles de expresión eran similares a los existentes en las células madre [544].

Adicionalmente se analizó el nivel de expresión de los genes que habíamos introducido ectópicamente para generar las iPSCs, ya que es muy importante que estos genes estén silenciados para llevar a cabo con éxito procesos posteriores de diferenciación celular. Se ha reportado que una expresión residual de los factores de reprogramación influye sobre el programa transcripcional y el estado epigenético de las iPSCs [427, 506, 630], y que es necesario que se produzca el silenciamiento de los genes de pluripotencia, que ocurre de forma espontánea en la mayoría de los clones, ya que la expresión mantenida de los factores de reprogramación o su reactivación no sólo influye negativamente sobre la diferenciación, sino que también induce inestabilidad cromosómica que puede favorecer la formación de tumores [506, 559, 631]. Los análisis de Q-PCR nos mostraron que se había llevado a cabo el silenciamiento de los genes ectópicos de forma espontánea, aunque el vector que utilizamos para la reprogramación, por tratarse de un vector escindible, nos brinda la posibilidad de eliminar estos genes posteriormente.

Otro estudio que está aceptado para demostrar el estado pluripotente de las células es que éstas puedan formar teratomas tras ser inyectadas en ratones inmunodeficientes [544, 632, 633], lo que hemos podido demostrar realizando este ensayo con células procedentes de cualquiera de los tres clones analizados. Es decir, los clones seleccionados para su estudio fueron capaces de dar lugar a tejidos correspondientes a las tres capas embrionarias.

Por último, otra de las pruebas estándar utilizadas para verificar el estado pluripotente de las iPSCs consiste en estudiar el patrón de metilación de distintos genes. Cuando se lleva a cabo la desdiferenciación celular uno de los procesos que tiene lugar es el silenciamiento de genes específicos del tipo celular de partida y la activación de genes que se expresan en estadios indiferenciados de la célula. Esto ocurre porque durante la reprogramación de las células somáticas se producen una serie de cambios epigenéticos cuyos mecanismos aún no están del todo dilucidados [545-550]. Uno de los más estudiados es la desmetilación de islas CpG situadas en los promotores de genes de pluripotencia [467, 634]. Así pues, llevamos a cabo una secuenciación con bisulfito de los promotores de los genes *OCT4* y *NANOG* que demostraron el estado hipometilado de éstos en las clones de iPSCs en comparación con unos fibroblastos control. Aunque es cierto que los promotores de los dos genes presentaban desmetilación de las islas CpG, se observó que el grado de ésta variaba entre ambos, siendo más pronunciada en el caso del promotor de *OCT3/4* que en el de *NANOG*. Esta diferencia ha sido comentada en artículos anteriores en los que se ha descrito que mientras que la regulación de la expresión de *OCT3/4* está influenciada notablemente por el estado de metilación del promotor, esto no ocurre de forma tan acusada en otros genes como *NANOG* y *SOX2* [547], ya que en su expresión están involucrados también otros mecanismos epigenéticos como, por ejemplo, la modificación del patrón de histonas [548].

Las iPSCs-AFeg expresan el gen *FANCA* y presentan una ruta de AF funcional.

Una vez comprobado el estado pluripotente de las células y que éstos contenían una copia del casete de RH en el sitio deseado del genoma para el cuál estaban diseñados los ZFNs, se evaluó si

existía expresión del gen *hFANCA* y si esta expresión conseguía restaurar la ruta de AF de modo que el fenotipo de estas células mimetizase un fenotipo normal. Hay que recordar que, por tratarse de una enfermedad monogénica recesiva, la presencia de una única copia correcta del gen afectado restaura la ruta de AF, ya que los individuos heterocigotos para la mutación en cualquiera de los genes de AF presentan un fenotipo normal.

Tanto a nivel génico como a nivel de proteína *FANCA* nuestros clones presentaron unos valores de expresión similares a los fisiológicos exhibidos por una línea CMEs. Este nivel de expresión fue suficiente para revertir el fenotipo de la patología y restaurar la ruta de AF, como indicó el análisis de focos de *FANCD2* y de aberraciones cromosómicas en presencia de DEB.

Puede llamar la atención que, a pesar de que el clon 31 expresa *hFANCA* a niveles fisiológicos y presenta focos de *FANCD2* en su núcleo, lo cual indica que se ha restaurado la ruta de AF, este clon muestra un alto número de células con aberraciones. Este extraño hecho no lo es tanto, pues ha sido descrito por varios autores que uno de los mayores problemas que surgen con el uso de las iPSCs es el incremento de la inestabilidad genética y de las aberraciones cromosómicas [551-553]. De hecho, incluso hay artículos que explican que esta inestabilidad genómica espontánea podría ser debida a varios factores entre los que se incluyen el daño de ADN inducido durante la reprogramación, el mantenimiento y manipulación de las células en cultivo, que los genomas de las células pluripotentes (CMEs e iPSCs) sean intrínsecamente inestables, o que ocurra una selección de mutaciones preexistentes en la célula original [635].

Por otro lado, observando en el clon 31 los datos relativos a la expresión de los factores de reprogramación ectópicos, apreciamos que estos genes no están completamente silenciados en este clon, mientras que el silenciamiento de éstos en los otros dos clones es mayor. Si recordamos lo expuesto anteriormente, la ausencia de un silenciamiento completo de los genes de reprogramación induce inestabilidad genómica, lo cual sería otro posible factor que puede haber influenciado sobre la aparición de aberraciones en este clon y no en los otros dos [506, 631].

Así pues, debido al notable número de aberraciones cromosómicas en el clon 31, éste fue descartado para su posterior diferenciación a células hematopoyéticas.

Finalmente, para completar el estudio de la corrección de la patología en los clones, se evaluó que la recuperación de la funcionalidad de la ruta de AF se debía a la manipulación que habíamos llevado a cabo para corregir la célula mediante la inserción del gen *FANCA* en el locus *AAVS1* por RH y no debido a una reversión de la mutación original. La comparación de las secuencias de ADN de los clones de iPSCs con la secuencia de los fibroblastos AF-52T confirmó que en los tres clones seguían estando presentes las dos mutaciones en el gen *FANCA* que causaban originalmente la patología [exón 8 (c.710-5T>C) y exón 36 (c.3558insG)] y también que la corrección no era el producto de contaminaciones con otras líneas celulares que se podrían haber producido durante el periodo de manipulación.

■ Escisión de los genes de reprogramación en un clon de iPSCs-AFeg.

Puesto que, como fue mencionado anteriormente, se ha demostrado que el silenciamiento de los factores de reprogramación introducidos ectópicamente es relevante para disminuir la

inestabilidad genómica y para conseguir una diferenciación más eficiente [506, 559, 631], lo cual es el objetivo final de este trabajo, llevamos a cabo la escisión de los genes de reprogramación en uno de los clones seleccionados utilizando un vector lentiviral integrativo que expresaba la proteína Cre Recombinasa y cuya eficacia en células iPSCs ya había sido descrito con anterioridad [452].

Se eligió el clon que presentaba una mayor escisión y se comprobó, por Q-PCR, la ausencia de expresión de los factores de reprogramación. Asimismo se llevaron a cabo en este clon todas aquellas pruebas necesarias para confirmar su estado pluripotente [544]. Se observó que el clon seleccionado y escindido presentaba una hipometilación de los promotores de los genes *NANOG* y *OCT3/4* aún más pronunciada que en el caso del clon sin escindir, lo cual puede ser debido a que la escisión de los factores de reprogramación permite una mayor remodelación a nivel epigenético. Este clon también fue capaz de generar teratomas cuando fue inyectado en ratones inmunodeficientes.

Por otro lado, se confirmó que en este clon se seguía expresando el gen *FANCA* a un nivel similar al fisiológico y que esto permitía restaurar la ruta de AF, como constató el estudio de estabilidad cromosómica tras tratar el clon escindido con un agente entrecruzante del ADN, el DEB.

■ Estudio del cariotipo y variaciones del número de copias de los clones generados.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la integridad genómica de las iPSCs es uno de los factores esenciales que hay que tener en cuenta para poder pensar en utilizar estas células en futuras aplicaciones terapéuticas.

Se ha observado que cuando las células son reprogramadas y mantenidas en cultivo como iPSCs, los clones adquieren ciertas anomalías que pueden ser consecuencia del proceso de reprogramación; del mantenimiento en cultivo de estas células y su expansión; o debido al procedimiento de corrección génica [487, 488, 551-554, 636, 637].

Pudimos comprobar que dos de los tres clones de iPSCs-AFeg analizados poseían un cariotipo normal, por lo que a pesar de que la aparición de aneuploidías no es un fenómeno extraño en la generación de iPSCs, se generaron dos clones sin evidencias de anomalías cariotípicas tras haber sido sometidos a los procesos de corrección por edición génica y de reprogramación celular.

Sin embargo, cuando realizamos un estudio más exhaustivo mediante un array de CGH observamos que sí que existían leves alteraciones en los clones de iPSCs generados a partir de fibroblastos AF-52T editados genéticamente. Estos resultados están en concordancia con trabajos publicados que verifican que las aneuploidías y ganancias y pérdidas de material genético son habituales en CMEs humanas e iPSCs que están durante largo tiempo en cultivo [377, 555].

En nuestro caso podemos descartar que estas alteraciones genéticas se deban al proceso de corrección mediante edición génica o de immortalización con la telomerasa, ya que no se observaron diferencias detectables por el array de CGH entre el genoma de los fibroblastos derivados del paciente (AF-52) y esos mismos fibroblastos tras ser immortalizados y corregidos (AF-52Teg). Es decir, el proceso de telomerización, corrección por editado génica mediante RH y expansión *in vitro* antes de generar iPSCs no indujo alteraciones genéticas detectables por CGH. Esto es especialmente relevante en células procedentes de AF, una enfermedad cuyos defectos en la reparación de daño en

el ADN induce una alta inestabilidad genética, efecto que hemos conseguido revertir tras su corrección mediante terapia genética dirigida.

Las alteraciones genéticas observadas en estos clones, por tanto, pueden ser debidas al estrés replicativo producido por el proceso de reprogramación y el tiempo en cultivo [637, 638], o simplemente que esta inestabilidad genómica simplemente sea una característica de las células pluripotentes, y no sólo de las iPSCs, sino también de las CMEs [488], estando descrito que el proceso de reprogramación induce a la generación de pequeñas delecciones que incluyen genes supresores de tumores.

Hay que mencionar que puesto que los dos clones presentan la misma delección cabe la posibilidad de que esta alteración estuviera presente ya en una pequeña fracción de las células originales y que no fuese detectada en el análisis de los fibroblastos procedentes del paciente, debido a que quizás estuviera presente en una fracción tan pequeña de la población que no haya podido ser revelada mediante array de CGH. Es importante mencionar que mediante el array CGH no se excluye la existencia de mosaicos genéticos de baja frecuencia (menor del 20%). Esta hipótesis surge de la existencia de artículos que sugieren que más de la mitad de las mutaciones observadas en las iPSCs ya están presentes en las células originales y que la selección de estas alteraciones sean las responsables de su prevalencia en las iPSCs [487, 639].

2.4. Diferenciación eficiente de iPSCs-AFeg a Progenitores Hematopoyéticos corregidos.

Como se ha insistido varias veces a lo largo de este trabajo, nuestro fin último es encontrar nuevas aproximaciones para paliar uno de los peores problemas que acaecen a los pacientes de AF, la aplasia medular. Por ello nos planteamos generar progenitores hematopoyéticos con un fenotipo sano, siguiendo una estrategia de la generación de iPSCs a partir de fibroblastos de AF corregidos.

Los resultados de diferenciación hematopoyética llevada a cabo en un clon de iPSCs (iPSC AF-Aeg16) y otro clon derivado de éste tras la escisión de los genes de reprogramación (iPSCs AF-Aeg16 escindido), demostraron que, aunque la escisión no había ocurrido completamente según sugerían los resultados de Q-PCR, el potencial de diferenciación hematopoyética mejoraba en el clon escindido de acuerdo con lo descrito por otros autores [516, 559].

Esta misma diferencia entre el clon escindido y el que no lo está, también se observó cuando se analizó la capacidad de formación de colonias hematopoyéticas a partir de los PHs diferenciados de ambos clones de iPSCs. Aunque los PHs derivados a partir de estos dos clones demostraron tener un potencial hematopoyético que permitió la generación de colonias, se observó que la formación de colonias hematopoyéticas estaba incrementada cuando se utilizaban para el cultivo clonogénico los PHs procedentes del clon escindido.

Finalmente, los PHs diferenciados a partir de iPSCs-AFeg demostraron ser resistentes a MMC, lo cual confirma que la expresión del gen *FANCA* insertado en el sitio seguro *AAVS1* bajo el promotor PGK permanece estable a lo largo de los diferentes estadios de diferenciación celular y no se ve silenciada.

Todos estos resultados confirman que es posible realizar la corrección de células de AF por RH en el sitio seguro *AAVS1* utilizando ZFNs con una alta especificidad para este locus y que el nivel

de expresión de *FANCA* alcanzado es suficiente para restaurar la ruta de AF y corregir el fenotipo patológico.

Además, ha sido posible generar iPSCs a partir de estas células corregidas por edición génica y éstas han sido diferenciadas eficientemente a PHs, mostrando todos estos tipos celulares una expresión del gen *FANCA* estable que es capaz de revertir el fenotipo de AF.

Estos avances abren una ventana hacia la posibilidad de utilizar esta aproximación en un futuro como terapia para los pacientes. Además, el tipo de estrategia utilizada, basada en la integración del gen deficiente en un sitio seguro del genoma y no en el interior del propio gen defectuoso, hace que esta aproximación sea aplicable, con la misma eficiencia, a cualquiera de los pacientes de AF-A independientemente del tipo de mutación y también a cualquiera de los pacientes de AF pertenecientes a otro grupo de complementación distinto del A, si se utiliza un vector donador con el ADNc de otro gen AF.

VI. CONCLUSIONES

A continuación se presentan las conclusiones obtenidas en cada uno de los dos objetivos planteados en esta memoria.

1. Desarrollo de un modelo de ratón humanizado que reproduzca el problema hematológico observado en los pacientes con anemia de Fanconi (AF).

- 1.1. Se ha diseñado y validado en una línea celular humana, un vector lentiviral, VL:sh7FANCA, que expresa de forma constitutiva horquillas pequeñas de ARN (shARN) que reconocen específicamente el ARNm del gen humano *FANCA* y que reduce la expresión de este gen, generando células con fenotipo de AF.
- 1.2. La transducción de células CD34⁺ humanas procedentes de sangre de cordón umbilical con el VL:sh7FANCA confiere a estas células un fenotipo comparable al de los progenitores hematopoyéticos procedentes de pacientes con AF.
- 1.3. Las células CD34⁺ interferidas en el gen *FANCA* injertan temporalmente en ratones inmunodeficientes, lo que ha permitido generar un modelo humanizado de la enfermedad hematológica.
- 1.4. El modelo humanizado de ratón defectivo en hFANCA ha sido una herramienta útil para validar la eficacia terapéutica del vector lentiviral que será utilizado en el ensayo clínico de terapia génica de pacientes AF-A (VL:PGK.FANCA.Wpre*) en un sistema *in vivo* con progenitores hematopoyéticos humanos con fenotipo de AF.

2. Generación de progenitores hematopoyéticos de pacientes del subtipo AF-A corregidos del defecto génico mediante técnicas de edición génica y reprogramación celular.

- 2.1. La cotransducción de células de pacientes con anemia de Fanconi del subtipo AF-A con vectores adenovirales portadores de ZFNs específicos para el locus *AAVS1* humano y de un vector lentiviral no integrativo portador del gen *EGFP* flanqueado por secuencias de homología del mismo locus nos ha permitido demostrar por primera vez que es posible llevar a cabo procesos de recombinación homóloga en el ADN genómico de células con AF del subtipo A (AF-A).
- 2.2. La co-transducción de fibroblastos de AF-A con los vectores adenovirales portadores de ZFNs que reconocen el locus seguro *AAVS1* y un nuevo vector lentiviral no integrativo portador del gen *FANCA* flanqueado por secuencias de homología de este locus seguro ha permitido realizar:
 - 2.2.1. La inserción única y específica del transgén terapéutico *FANCA* en el sitio seguro del genoma *AAVS1*.
 - 2.2.2. La corrección de los defectos fenotípicos característicos de células con AF-A.
- 2.3. La reprogramación de los fibroblastos corregidos mediante técnicas de edición génica constituye una técnica eficaz para generar células inducidas pluripotentes (iPSCs) corregidas genéticamente portadoras de una inserción única del gen *FANCA* en el locus seguro *AAVS1*. La generación de estas iPSCs editadas genéticamente se vio claramente favorecida cuando los

fibroblastos fueron previamente transducidos con un vector lentiviral portador del gen *hTERT*.

- 2.4. El estudio citogenético de las células generadas a lo largo de los procesos descritos demuestra la ausencia de alteraciones genéticas detectables durante los procesos de expansión y edición génica de los fibroblastos con AF-A. Sin embargo, la reprogramación celular se asoció con la generación de determinadas alteraciones génicas en las iPSCs.
- 2.5. La re-diferenciación de las iPSCs AF-A corregidas por edición génica hacia células del linaje hematopoyético permite la generación progenitores hematopoyéticos corregidos genéticamente. La escisión del vector de reprogramación mejoró significativamente la eficacia de generación de estos progenitores hematopoyéticos.

-Corolario-

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos en esta memoria nos han permitido generar un nuevo modelo experimental humanizado que simula el fallo de médula ósea característico de la AF, lo que facilitará la investigación de la etiología y el desarrollo de nuevas terapias de la aplasia medular de la AF.

Por otra parte, en virtud de los resultados mostrados, el uso de las técnicas de edición génica y reprogramación celular se contempla como una nueva aproximación de terapia génica particularmente relevante para pacientes sin reserva medular de células madre hematopoyéticas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Dokal I: **Fanconi anemia is a highly penetrant cancer susceptibility syndrome.** *Haematologica* 2008, **93**:486-488.
2. Lensch MW, Tischkowitz M, Christianson TA, Reifsteck CA, Speckhart SA, Jakobs PM, O'Dwyer ME, Olson SB, Le Beau MM, Hodgson SV, et al: **Acquired FANCA dysfunction and cytogenetic instability in adult acute myelogenous leukemia.** *Blood* 2003, **102**:7-16.
3. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP: **Cancer incidence in persons with Fanconi anemia.** *Blood* 2003, **101**:822-826.
4. Dokal I, Vulliamy T: **Inherited aplastic anaemias/bone marrow failure syndromes.** *Blood Rev* 2008, **22**:141-153.
5. Shimamura A, Alter BP: **Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes.** *Blood Rev* 2010, **24**:101-122.
6. Gonzalez-Murillo A, Lozano ML, Alvarez L, Jacome A, Almarza E, Navarro S, Segovia JC, Hanenberg H, Guenechea G, Bueren JA, Rio P: **Development of lentiviral vectors with optimized transcriptional activity for the gene therapy of patients with Fanconi anemia.** *Hum Gene Ther* 2010, **21**:623-630.
7. Lombardo A, Cesana D, Genovese P, Di Stefano B, Provati E, Colombo DF, Neri M, Magnani Z, Cantore A, Lo Riso P, et al: **Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer.** *Nat Methods* 2011, **8**:861-869.
8. Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P, Kaeppl C, Nowrouzi A, Bartholomae CC, Wang J, Friedman G, et al: **An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**:816-823.
9. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S: **Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.** *Cell* 2007, **131**:861-872.
10. Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G: **Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette.** *Stem Cells* 2009, **27**:543-549.
11. Fanconi G: **Familiäre infantile perniziösaartige Anämie (perniciöses Blutbild und Konstitution).** *Jahrbuch für Kinderheilkunde und Erziehung (Wien)* 1927, **117**:257-280.
12. Schroeder T, Anschutz F, Knopp A: **Spontaneous Chromosome aberrations in Familial Panmyelopathy.** *Human Genetic* 1964, **1**:194-196.
13. Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W: **Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry.** *Haematologica* 2008, **93**:511-517.
14. Deans AJ, West SC: **DNA interstrand crosslink repair and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2011, **11**:467-480.
15. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M: **Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation.** *Nature* 1992, **356**:763-767.
16. Wang W: **Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins.** *Nat Rev Genet* 2007, **8**:735-748.
17. Ciccio A, Ling C, Coulthard R, Yan Z, Xue Y, Meetei AR, Laghmani el H, Joenje H, McDonald N, de Winter JP, et al: **Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM.** *Mol Cell* 2007, **25**:331-343.
18. Collis SJ, Ciccio A, Deans AJ, Horejsi Z, Martin JS, Maslen SL, Skehel JM, Elledge SJ, West SC, Boulton SJ: **FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex.** *Mol Cell* 2008, **32**:313-324.
19. Schwab RA, Blackford AN, Niedzwiedz W: **ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells.** *EMBO J* 2010, **29**:806-818.
20. Singh TR, Saro D, Ali AM, Zheng XF, Du CH, Killen MW, Sachpatzidis A, Wahengbam K, Pierce AJ, Xiong Y, et al: **MHF1-MHF2, a histone-fold-containing protein complex, participates in the Fanconi anemia pathway via FANCM.** *Mol Cell* 2010, **37**:879-886.

21. Huang M, Kennedy R, Ali AM, Moreau LA, Meetei AR, D'Andrea AD, Chen CC: **Human MutS and FANCM complexes function as redundant DNA damage sensors in the Fanconi Anemia pathway.** *DNA Repair (Amst)* 2011, **10**:1203-1212.
22. Cohn MA, D'Andrea AD: **Chromatin recruitment of DNA repair proteins: lessons from the fanconi anemia and double-strand break repair pathways.** *Mol Cell* 2008, **32**:306-312.
23. Kim JM, Kee Y, Gurtan A, D'Andrea AD: **Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24.** *Blood* 2008, **111**:5215-5222.
24. Cole AR, Lewis LP, Walden H: **The structure of the catalytic subunit FANCL of the Fanconi anemia core complex.** *Nat Struct Mol Biol* 2010, **17**:294-298.
25. Garner E, Smogorzewska A: **Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway.** *FEBS Lett* 2011, **585**:2853-2860.
26. Alter BP, Greene MH, Velazquez I, Rosenberg PS: **Cancer in Fanconi anemia.** *Blood* 2003, **101**:2072.
27. Crossan GP, Patel KJ: **The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA.** *J Pathol* 2012, **226**:326-337.
28. Huang M, D'Andrea AD: **A new nuclease member of the FAN club.** *Nat Struct Mol Biol* 2010, **17**:926-928.
29. Yamamoto KN, Kobayashi S, Tsuda M, Kurumizaka H, Takata M, Kono K, Jiricny J, Takeda S, Hirota K: **Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:6492-6496.
30. Ciccia A, McDonald N, West SC: **Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins.** *Annu Rev Biochem* 2008, **77**:259-287.
31. Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD, Bernards R: **The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway.** *Mol Cell* 2005, **17**:331-339.
32. Cohn MA, Kowal P, Yang K, Haas W, Huang TT, Gygi SP, D'Andrea AD: **A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway.** *Mol Cell* 2007, **28**:786-797.
33. Casado JA, Callen E, Jacome A, Rio P, Castella M, Lobitz S, Ferro T, Munoz A, Sevilla J, Cantalejo A, et al: **A comprehensive strategy for the subtyping of Fanconi Anemia patients: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia research network.** *J Med Genet* 2007, **44**:241-249.
34. consortium FaBc: **Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene.** *Nat Genet* 1996, **14**:324-328.
35. Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen DF, Savoia A, et al: **Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA.** *Nat Genet* 1996, **14**:320-323.
36. Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, et al: **X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B.** *Nat Genet* 2004, **36**:1219-1224.
37. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, et al: **Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia.** *Science* 2002, **297**:606-609.
38. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, Thorlacius S, Offit K, Stoppa-Lyonnet D, et al: **The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds.** *Nat Genet* 1996, **12**:333-337.
39. Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, et al: **Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2.** *Mol Cell* 2001, **7**:241-248.
40. de Winter JP, Leveille F, van Berkel CG, Rooimans MA, van Der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan NV, Alon N, Bosnoyan-Collins L, et al: **Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene.** *Am J Hum Genet* 2000, **67**:1306-1308.

41. de Winter JP, Rooimans MA, van Der Weel L, van Berkel CG, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, et al: **The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM.** *Nat Genet* 2000, **24**:15-16.
42. de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, van Berkel CG, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Carreau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, et al: **The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9.** *Nat Genet* 1998, **20**:281-283.
43. Garcia-Higuera I, Kuang Y, Naf D, Wasik J, D'Andrea AD: **Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC, and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:4866-4873.
44. Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, Hoatlin ME, Waisfisz Q, Arwert F, de Winter JP, Joenje H: **Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes.** *Blood* 2004, **103**:2498-2503.
45. Dorsman JC, Levitus M, Rockx D, Rooimans MA, Oostra AB, Haitjema A, Bakker ST, Steltenpool J, Schuler D, Mohan S, et al: **Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI.** *Cell Oncol* 2007, **29**:211-218.
46. Sims AE, Spiteri E, Sims RJ, 3rd, Arita AG, Lach FP, Landers T, Wurm M, Freund M, Neveling K, Hanenberg H, et al: **FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway.** *Nat Struct Mol Biol* 2007, **14**:564-567.
47. Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, Ballif BA, Gygi SP, Hofmann K, D'Andrea AD, Elledge SJ: **Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair.** *Cell* 2007, **129**:289-301.
48. Ishiai M, Kitao H, Smogorzewska A, Tomida J, Kinomura A, Uchida E, Saberi A, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T, et al: **FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway.** *Nat Struct Mol Biol* 2008, **15**:1138-1146.
49. Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, de Vries Y, Hussain S, Wiegant WW, Elghalbzouri-Maghrani E, Steltenpool J, Rooimans MA, Pals G, et al: **The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J.** *Nat Genet* 2005, **37**:934-935.
50. Levran O, Attwooll C, Henry RT, Milton KL, Neveling K, Rio P, Batish SD, Kalb R, Velleuer E, Barral S, et al: **The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia.** *Nat Genet* 2005, **37**:931-933.
51. Litman R, Peng M, Jin Z, Zhang F, Zhang J, Powell S, Andreassen PR, Cantor SB: **BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI.** *Cancer Cell* 2005, **8**:255-265.
52. Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, et al: **A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia.** *Nat Genet* 2003, **35**:165-170.
53. Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, et al: **A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M.** *Nat Genet* 2005, **37**:958-963.
54. Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, Reid S, Spanova K, Barfoot R, Chagtai T, et al: **PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene.** *Nat Genet* 2006.
55. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal S, Freund M, et al: **Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer.** *Nat Genet* 2006.
56. Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, de Vries Y, Rooimans MA, Sheng Q, Pals G, Errami A, Gluckman E, Llera J, et al: **Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2.** *Nat Genet* 2007, **39**:159-161.
57. Zhang F, Ma J, Wu J, Ye L, Cai H, Xia B, Yu X: **PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response.** *Curr Biol* 2009.

58. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, Neveling K, Endt D, Kesterton I, Autore F, et al: **Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder.** *Nat Genet* 2010, **42**:406-409.
59. Stoepker C, Hain K, Schuster B, Hilhorst-Hofstee Y, Rooimans MA, Steltenpool J, Oostra AB, Eirich K, Korthof ET, Nieuwint AW, et al: **SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype.** *Nat Genet* 2011.
60. Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A: **Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia.** *Nat Genet* 2011.
61. Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, Derkunt B, Su Y, Raams A, Trujillo JP, Minguillon J, Ramirez MJ, Pujol R, et al: **Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia.** *Am J Hum Genet* 2013, **92**:800-806.
62. Kee Y, D'Andrea AD: **Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia.** *J Clin Invest* 2012, **122**:3799-3806.
63. Joenje H, Patel KJ: **The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia.** *Nat Rev Genet* 2001, **2**:446-457.
64. Callen E, Casado JA, Tischkowitz MD, Bueren JA, Creus A, Marcos R, Dasi A, Estella JM, Munoz A, Ortega JJ, et al: **A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain.** *Blood* 2005, **105**:1946-1949.
65. D'Andrea AD, Grompe M: **Molecular Biology of Fanconi Anemia: Implications for Diagnosis and Therapy.** *Blood* 1997, **90**:1725-1736.
66. Tischkowitz M, Dokal I: **Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects.** *Br J Haematol* 2004, **126**:176-191.
67. Auerbach AD, Buchwald M, and Jonje H: **Fanconi Anemia.** In *The Genetic Basis of Human Cancer*. Edited by Vogelstein B, K.W. New York, N.Y: McGraw-Hill; 1998: 317-332
68. Alter BP: **Bone marrow failure: a child is not just a small adult (but an adult can have a childhood disease).** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:96-103.
69. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, Hanenberg H, Auerbach AD: **A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR).** *Blood* 2003, **101**:1249-1256.
70. Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W: **Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry.** *Haematologica* 2008.
71. Cioc AM, Wagner JE, MacMillan ML, DeFor T, Hirsch B: **Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics.** *Am J Clin Pathol* 2010, **133**:92-100.
72. Neveling K, Endt D, Hoehn H, Schindler D: **Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia.** *Mutat Res* 2009, **668**:73-91.
73. Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Veerman AJ, van Weel M, Pauli RM, Shahidi NT, Dokal I, Roberts I, et al: **Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance.** *Eur J Hum Genet* 1997, **5**:137-148.
74. Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, de Winter JP, van Berkel CG, Hoatlin ME, Ianzano L, Gibson RA, Arwert F, Savoia A, et al: **Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism.** *Nat Genet* 1999, **22**:379-383.
75. Gregory JJ, Jr., Wagner JE, Verlander PC, Levrin O, Batish SD, Eide CR, Steffenhagen A, Hirsch B, Auerbach AD: **Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:2532-2537.
76. Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P, Esperou H, Ferry C, Jubert C, Feugeas JP, et al: **Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway.** *Blood* 2005, **105**:1329-1336.
77. Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H: **Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction.** *Cytogenet Genome Res* 2002, **98**:126-135.

78. Youssoufian H: **Natural gene therapy and the Darwinian legacy.** *Nat Genet* 1996, **13**:255-256.
79. Ceccaldi R, Briot D, Larghero J, Vasquez N, Dubois d'Enghien C, Chamousset D, Noguera ME, Waisfisz Q, Hermine O, Pondarre C, et al: **Spontaneous abrogation of the G2 DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients.** *J Clin Invest* 2010.
80. Schuler D, Kiss A, Fabian F: **Chromosomal peculiarities and "in vitro" examinations in Fanconi's anaemia.** *Humangenetik* 1969, **7**:314-322.
81. Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM: **International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity.** *Blood* 1989, **73**:391-396.
82. Castella M, Pujol R, Callen E, Ramirez MJ, Casado JA, Talavera M, Ferro T, Munoz A, Sevilla J, Madero L, et al: **Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact.** *J Med Genet* 2011.
83. Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux AM, Buriot D, Prieur M: **The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia.** *Hum Genet* 1982, **62**:327-332.
84. Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS: **Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent edomitosis in Fanconi anemia cells.** *Am J Hum Genet* 1985, **37**:1022-1030.
85. Seyschab H, Friedl R, Sun Y, Schindler D, Hoehn H, Hentze S, Schroeder-Kurth T: **Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia.** *Blood* 1995, **85**:2233-2237.
86. Pulsipher M, Kupfer GM, Naf D, Suliman A, Lee JS, Jakobs P, Grompe M, Joenje H, Sieff C, Guinan E, et al: **Subtyping analysis of Fanconi anemia by immunoblotting and retroviral gene transfer.** *Mol Med* 1998, **4**:468-479.
87. Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Oostra AB: **Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia.** *Nature* 1981, **290**:142-143.
88. Saito H, Hammond AT, Moses RE: **Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells.** *Mutat Res* 1993, **294**:255-262.
89. Schindler D, Hoehn H: **Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen.** *Am J Hum Genet* 1988, **43**:429-435.
90. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET: **Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model.** *Biophys J* 2001, **81**:675-684.
91. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD: **Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:5431-5436.
92. Leteurtre F, Li X, Guardiola P, Le Roux G, Sergere JC, Richard P, Carosella ED, Gluckman E: **Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia.** *Br J Haematol* 1999, **105**:883-893.
93. Callen E, Samper E, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Ortega JJ, Olive T, Badell I, Blasco MA, Surrallés J: **Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia.** *Hum Mol Genet* 2002, **11**:439-444.
94. Rosselli F, Sanceau J, Gluckman E, Wietzerbin J, Moustacchi E: **Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor alpha.** *Blood* 1994, **83**:1216-1225.
95. Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Poggi V, Beka'ssy AN, Scime R, Pistorio A, Pistoia V: **TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro.** *Blood* 2003, **102**:2053-2059.
96. Schultz JC, Shahidi NT: **Tumor necrosis factor-alpha overproduction in Fanconi's anemia.** *Am J Hematol* 1993, **42**:196-201.
97. Ibanez A, Rio P, Casado JA, Bueren JA, Fernandez-Luna JL, Pipaon C: **Elevated levels of IL-1beta in Fanconi anaemia group A patients due to a constitutively active phosphoinositide**

- 3-kinase-Akt pathway are capable of promoting tumour cell proliferation.** *Biochem J* 2009, **422**:161-170.
98. Li J, Sejas DP, Zhang X, Qiu Y, Nattamai KJ, Rani R, Rathbun KR, Geiger H, Williams DA, Bagby GC, Pang Q: **TNF-alpha induces leukemic clonal evolution ex vivo in Fanconi anemia group C murine stem cells.** *J Clin Invest* 2007, **117**:3283-3295.
 99. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P: **Non-apoptotic Fas signaling.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2003, **14**:53-66.
 100. Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ: **Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**:2336-2340.
 101. Rio P, Agirre X, Garate L, Banos R, Alvarez L, San Jose-Eneriz E, Badell I, Casado JA, Garin M, Prosper F, Bueren JA: **Downregulated expression of hsa-miR-181c in Fanconi anemia patients: implications in TNFalpha regulation and proliferation of hematopoietic progenitor cells.** *Blood* 2012.
 102. Mehta PA, Svahn J, Davies SM, Pang Q, Harris R, Ghezzi P, Lanza T, Ferretti E, Barabino P, Mueller R, Dufour C: **Etanercept treatment in Fanconi anaemia; combined US and Italian experience.** *Br J Haematol* 2012, **158**:809-811.
 103. Zhang X, Shang X, Guo F, Murphy K, Kirby M, Kelly P, Reeves L, Smith FO, Williams DA, Zheng Y, Pang Q: **Defective homing is associated with altered Cdc42 activity in cells from Fanconi anemia group A patients.** *Blood* 2008.
 104. Pilonetto DV, Pereira NF, Bitencourt MA, Magdalena NI, Vieira ER, Veiga LB, Cavalli IJ, Ribeiro RC, Pasquini R: **FANCD2 Western blot as a diagnostic tool for Brazilian patients with Fanconi anemia.** *Braz J Med Biol Res* 2009, **42**:237-243.
 105. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD: **Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway.** *Mol Cell* 2001, **7**:249-262.
 106. Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Santos G, Gordon-Smith EC, Gale RP, Rapoport JM, Storb R: **Severe aplastic anemia: a prospective study of the effect of early marrow transplantation on acute mortality.** *Blood* 1976, **48**:63-70.
 107. Shahidi NT, Diamond LK: **Testosterone-induced remission in aplastic anemia of both acquired and congenital types. Further observations in 24 cases.** *N Engl J Med* 1961, **264**:953-967.
 108. Dufour C, Svahn J: **Fanconi anaemia: new strategies.** *Bone Marrow Transplant* 2008, **41 Suppl 2**:S90-95.
 109. Velazquez I, Alter BP: **Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions.** *Am J Hematol* 2004, **77**:257-267.
 110. Scheckenbach K, Morgan M, Filger-Brillinger J, Sandmann M, Strimling B, Scheurlen W, Schindler D, Gobel U, Hanenberg H: **Treatment of the bone marrow failure in Fanconi anemia patients with danazol.** *Blood Cells Mol Dis* 2012, **48**:128-131.
 111. Guinan EC, Lopez KD, Huhn RD, Felser JM, Nathan DG: **Evaluation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of pancytopenia in children with fanconi anemia.** *J Pediatr* 1994, **124**:144-150.
 112. Rackoff WR, Orazi A, Robinson CA, Cooper RJ, Alter BP, Freedman MH, Harris RE, Williams DA: **Prolonged administration of granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) to patients with Fanconi anemia: a pilot study.** *Blood* 1996, **88**:1588-1593.
 113. Macmillan ML, Wagner JE: **Haematopoietic cell transplantation for Fanconi anaemia - when and how?** *Br J Haematol* 2010, **Epub 2010 Feb 5**.
 114. Farzin A, Davies SM, Smith FO, Filipovich A, Hansen M, Auerbach AD, Harris RE: **Matched sibling donor haematopoietic stem cell transplantation in Fanconi anaemia: an update of the Cincinnati Children's experience.** *Br J Haematol* 2007, **136**:633-640.
 115. Pasquini R, Carreras J, Pasquini MC, Camitta BM, Fasth AL, Hale GA, Harris RE, Marsh JC, Robinson AJ, Zhang MJ, et al: **HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation**

- for fanconi anemia: comparison of irradiation and nonirradiation containing conditioning regimens.** *Biol Blood Marrow Transplant* 2008, **14**:1141-1147.
116. Bonfim CM, de Medeiros CR, Bitencourt MA, Zanis-Neto J, Funke VA, Setubal DC, Ruiz J, Sanders JE, Flowers ME, Kiem HP, et al: **HLA-matched related donor hematopoietic cell transplantation in 43 patients with Fanconi anemia conditioned with 60 mg/kg of cyclophosphamide.** *Biol Blood Marrow Transplant* 2007, **13**:1455-1460.
 117. Gluckman E: **Allogeneic bone marrow transplantation in Fanconi anemia.** *Bone Marrow Transplant* 1996, **18**:S33-35.
 118. Guardiola P, Pasquini R, Dokal I, Ortega JJ, van Weel-Sipman M, Marsh JC, Ball SE, Locatelli F, Vermynen C, Skinner R, et al: **Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.** *Blood* 2000, **95**:422-429.
 119. Wagner JE, Eapen M, MacMillan ML, Harris RE, Pasquini R, Boulad F, Zhang MJ, Auerbach AD: **Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia.** *Blood* 2007, **109**:2256-2262.
 120. Gluckman E, Berger R, Dutreix J: **Bone marrow transplantation for Fanconi anemia.** *Semin Hematol* 1984, **21**:20-26.
 121. Aker M, Varadi G, Slavin S, Nagler A: **Fludarabine-based protocol for human umbilical cord blood transplantation in children with Fanconi anemia.** *J Pediatr Hematol Oncol* 1999, **21**:237-239.
 122. Chaudhury S, Auerbach AD, Kernan NA, Small TN, Prockop SE, Scaradavou A, Heller G, Wolden S, O'Reilly RJ, Boulad F: **Fludarabine-based cytoreductive regimen and T-cell-depleted grafts from alternative donors for the treatment of high-risk patients with Fanconi anaemia.** *Br J Haematol* 2008, **140**:644-655.
 123. MacMillan ML, Hughes MR, Agarwal S, Daley GQ: **Cellular therapy for fanconi anemia: the past, present, and future.** *Biol Blood Marrow Transplant* 2011, **17**:S109-114.
 124. Rosenberg PS, Socie G, Alter BP, Gluckman E: **Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants.** *Blood* 2005, **105**:67-73.
 125. Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A: **Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching.** *Jama* 2001, **285**:3130-3133.
 126. Grewal SS, Kahn JP, MacMillan ML, Ramsay NK, Wagner JE: **Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA-genotype-identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis.** *Blood* 2004, **103**:1147-1151.
 127. Du W, Adam Z, Rani R, Zhang X, Pang Q: **Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression.** *Antioxid Redox Signal* 2008, **10**:1909-1921.
 128. Zhang QS, Marquez-Loza L, Eaton L, Duncan AW, Goldman DC, Anur P, Watanabe-Smith K, Rathbun RK, Fleming WH, Bagby GC, Grompe M: **Fancd2^{-/-} mice have hematopoietic defects that can be partially corrected by resveratrol.** *Blood* 2010, **116**:5140-5148.
 129. Ponte F, Sousa R, Fernandes AP, Goncalves C, Barbot J, Carvalho F, Porto B: **Improvement of genetic stability in lymphocytes from Fanconi anemia patients through the combined effect of alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine.** *Orphanet J Rare Dis* 2012, **7**:28.
 130. Larochelle A, Dunbar CE: **Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: Assessing the Relevance of Pre-Clinical Models.** *Semin Hematol* 2013, **50**:101-130.
 131. Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Veerman AJ, van Weel M, Pauli RM, Shahidi NT, Dokal I, Roberts I, et al: **Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance.** *Eur J Hum Genet* 1997, **5**:137-148.
 132. Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, de Winter JP, van Berkel CG, Hoatlin ME, Ianzano L, Gibson RA, Arwert F, Savoia A, et al: **Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism.** *Nat Genet* 1999, **22**:379-383.

133. Mankad A, Taniguchi T, Cox B, Akkari Y, Rathbun RK, Lucas L, Bagby G, Olson S, D'Andrea A, Grompe M: **Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi anemia.** *Blood* 2006, **107**:3084-3090.
134. Rio P, Meza NW, Gonzalez-Murillo A, Navarro S, Alvarez L, Surrallés J, Castella M, Guenechea G, Segovia JC, Hanenberg H, Bueren JA: **In vivo proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1.** *Blood* 2008, **112**:4853-4861.
135. Takahashi K, Yamanaka S: **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** *Cell* 2006, **126**:663-676.
136. Raya A, Rodríguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castella M, Rio P, Sleep E, et al: **Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells.** *Nature* 2009, **460**:53-59.
137. Crossan GP, van der Weyden L, Rosado IV, Langevin F, Gaillard PH, McIntyre RE, Gallagher F, Kettunen MI, Lewis DY, Brindle K, et al: **Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia.** *Nat Genet* 2011, **43**:147-152.
138. Hadjur S, Ung K, Wadsworth L, Dimmick J, Rajcan-Separovic E, Scott RW, Buchwald M, Jirik FR: **Defective hematopoiesis and hepatic steatosis in mice with combined deficiencies of the genes encoding Fancc and Cu/Zn superoxide dismutase.** *Blood* 2001, **98**:1003-1011.
139. Garaycoechea JI, Crossan GP, Langevin F, Daly M, Arends MJ, Patel KJ: **Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function.** *Nature* 2012, **489**:571-575.
140. Chen M, Tomkins DJ, Auerbach W, McKerlie C, Youssoufian H, Liu L, Gan O, Carreau M, Auerbach A, Groves T, et al: **Inactivation of Fac in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anaemia.** *Nat Genet* 1996, **12**:448-451.
141. Whitney MA, Royle G, Low MJ, Kelly MA, Axthelm MK, Reifsteck C, Olson S, Braun RE, Heinrich MC, Rathbun RK, et al: **Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene.** *Blood* 1996, **88**:49-58.
142. Cheng NC, van de Vrugt HJ, van der Valk MA, Oostra AB, Krimpenfort P, de Vries Y, Joenje H, Berns A, Arwert F: **Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog Fanca.** *Hum Mol Genet* 2000, **9**:1805-1811.
143. Rio P, Segovia JC, Hanenberg H, Casado JA, Martínez J, Gottsche K, Cheng NC, Van de Vrugt HJ, Arwert F, Joenje H, Bueren JA: **In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice.** *Blood* 2002, **100**:2032-2039.
144. Wong JC, Alon N, McKerlie C, Huang JR, Meyn MS, Buchwald M: **Targeted disruption of exons 1 to 6 of the Fanconi Anemia group A gene leads to growth retardation, strain-specific microphthalmia, meiotic defects and primordial germ cell hypoplasia.** *Hum Mol Genet* 2003, **12**:2063-2076.
145. Yang Y, Kuang Y, De Oca RM, Hays T, Moreau L, Lu N, Seed B, D'Andrea AD: **Targeted disruption of the murine Fanconi anemia gene, Fancg/Xrcc9.** *Blood* 2001, **98**:3435-3440.
146. AgoulNIK AI, Lu B, Zhu Q, Truong C, Ty MT, Arango N, Chada KK, Bishop CE: **A novel gene, Pog, is necessary for primordial germ cell proliferation in the mouse and underlies the germ cell deficient mutation, gcd.** *Hum Mol Genet* 2002, **11**:3047-3053.
147. Bakker ST, van de Vrugt HJ, Visser JA, Delzenne-Goette E, van der Wal A, Berns MA, van de Ven M, Oostra AB, de Vries S, Kramer P, et al: **Fancf-deficient mice are prone to develop ovarian tumours.** *J Pathol* 2012, **226**:28-39.
148. Bakker ST, van de Vrugt HJ, Rooimans MA, Oostra AB, Steltenpool J, Delzenne-Goette E, van der Wal A, van der Valk M, Joenje H, te Riele H, de Winter JP: **Fancm-deficient mice reveal unique features of Fanconi anemia complementation group M.** *Hum Mol Genet* 2009, **18**:3484-3495.

149. Houghtaling S, Timmers C, Noll M, Finegold MJ, Jones SN, Meyn MS, Grompe M: **Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice.** *Genes Dev* 2003, **17**:2021-2035.
150. McAllister KA, Bennett LM, Houle CD, Ward T, Malphurs J, Collins NK, Cachafeiro C, Haseman J, Goulding EH, Bunch D, et al: **Cancer susceptibility of mice with a homozygous deletion in the COOH-terminal domain of the Brca2 gene.** *Cancer Res* 2002, **62**:990-994.
151. Rantakari P, Nikkila J, Jokela H, Ola R, Pylkas K, Lagerbohm H, Sainio K, Poutanen M, Winqvist R: **Inactivation of Palb2 gene leads to mesoderm differentiation defect and early embryonic lethality in mice.** *Hum Mol Genet* 2010, **19**:3021-3029.
152. Bouwman P, Drost R, Klijn C, Pieterse M, van der Gulden H, Song JY, Szuhai K, Jonkers J: **Loss of p53 partially rescues embryonic development of Palb2 knockout mice but does not foster haploinsufficiency of Palb2 in tumour suppression.** *J Pathol* 2011, **224**:10-21.
153. Kuznetsov S, Pellegrini M, Shuda K, Fernandez-Capetillo O, Liu Y, Martin BK, Burkett S, Southon E, Pati D, Tessarollo L, et al: **RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females.** *J Cell Biol* 2007, **176**:581-592.
154. Kim JM, Parmar K, Huang M, Weinstock DM, Ruit CA, Kutok JL, D'Andrea AD: **Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype.** *Dev Cell* 2009, **16**:314-320.
155. Houghtaling S, Granville L, Akkari Y, Torimaru Y, Olson S, Finegold M, Grompe M: **Heterozygosity for p53 (Trp53+/-) accelerates epithelial tumor formation in fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice.** *Cancer Res* 2005, **65**:85-91.
156. Freie B, Li X, Ciccone SL, Nawa K, Cooper S, Vogelweid C, Schantz L, Haneline LS, Orazi A, Broxmeyer HE, et al: **Fanconi anemia type C and p53 cooperate in apoptosis and tumorigenesis.** *Blood* 2003, **102**:4146-4152.
157. van de Vrugt HJ, Eaton L, Hanlon Newell A, Al-Dhalimy M, Liskay RM, Olson SB, Grompe M: **Embryonic lethality after combined inactivation of Fancd2 and Mlh1 in mice.** *Cancer Res* 2009, **69**:9431-9438.
158. Pulliam-Leath AC, Ciccone SL, Nalepa G, Li X, Si Y, Miravalle L, Smith D, Yuan J, Li J, Anur P, et al: **Genetic disruption of both Fancd2 and Fancg in mice recapitulates the hematopoietic manifestations of Fanconi anemia.** *Blood* 2010, **116**:2915-2920.
159. Shultz LD, Pearson T, King M, Giassi L, Carney L, Gott B, Lyons B, Rossini AA, Greiner DL: **Humanized NOD/LtSz-scid IL2 receptor common gamma chain knockout mice in diabetes research.** *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1103**:77-89.
160. Ito M, Kobayashi K, Nakahata T: **NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2008, **324**:53-76.
161. McDermott SP, Eppert K, Lechman ER, Doedens M, Dick JE: **Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains.** *Blood* 2010, **116**:193-200.
162. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998, **391**:806-811.
163. Carthew RW, Sontheimer EJ: **Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.** *Cell* 2009, **136**:642-655.
164. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA: **Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**:457-467.
165. Kim DH, Rossi JJ: **Strategies for silencing human disease using RNA interference.** *Nat Rev Genet* 2007, **8**:173-184.
166. Siomi MC: **Short interfering RNA-mediated gene silencing; towards successful application in human patients.** *Adv Drug Deliv Rev* 2009, **61**:668-671.
167. Siomi H, Siomi MC: **On the road to reading the RNA-interference code.** *Nature* 2009, **457**:396-404.

168. Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, Hovanessian AG: **Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon.** *Cell* 1990, **62**:379-390.
169. Whitehead KA, Langer R, Anderson DG: **Knocking down barriers: advances in siRNA delivery.** *Nat Rev Drug Discov* 2009, **8**:129-138.
170. Jackson AL, Linsley PS: **Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application.** *Nat Rev Drug Discov* 2010, **9**:57-67.
171. Castanotto D, Sakurai K, Lingeman R, Li H, Shively L, Aagaard L, Soifer H, Gatignol A, Riggs A, Rossi JJ: **Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:5154-5164.
172. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA: **Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways.** *Nature* 2006, **441**:537-541.
173. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T: **RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs.** *Genes Dev* 2001, **15**:188-200.
174. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ: **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.** *Nature* 2001, **409**:363-366.
175. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH: **Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*.** *Genes Dev* 2001, **15**:2654-2659.
176. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD: **Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.** *Cell* 2003, **115**:199-208.
177. Tomari Y, Zamore PD: **Perspective: machines for RNAi.** *Genes Dev* 2005, **19**:517-529.
178. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: **A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells.** *Science* 2002, **296**:550-553.
179. Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR: **Effective expression of small interfering RNA in human cells.** *Nat Biotechnol* 2002, **20**:505-508.
180. Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL: **RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:6047-6052.
181. Wiznerowicz M, Trono D: **Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference.** *J Virol* 2003, **77**:8957-8961.
182. Szulc J, Wiznerowicz M, Sauvain MO, Trono D, Aebischer P: **A versatile tool for conditional gene expression and knockdown.** *Nat Methods* 2006, **3**:109-116.
183. Kay MA: **State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead.** *Nat Rev Genet* 2011, **12**:316-328.
184. Mingozzi F, High KA: **Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges.** *Nat Rev Genet* 2011, **12**:341-355.
185. Copelan EA: **Hematopoietic stem-cell transplantation.** *N Engl J Med* 2006, **354**:1813-1826.
186. Biffi A, Montini E, Loricoli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, Baldoli C, Martino S, Calabria A, Canale S, et al: **Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Benefits Metachromatic Leukodystrophy.** *Science* 2013.
187. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, Dionisio F, Calabria A, Giannelli S, Castiello MC, et al: **Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in Patients with Wiskott-Aldrich Syndrome.** *Science* 2013.
188. Cavazzana-Calvo M, Andre-Schmutz I, Fischer A: **Haematopoietic stem cell transplantation for SCID patients: where do we stand?** *Br J Haematol* 2013, **160**:146-152.
189. Carbonaro DA, Zhang L, Jin X, Montiel-Equihua C, Geiger S, Carmo M, Cooper A, Fairbanks L, Kaufman ML, Sebire NJ, et al: **Pre-clinical demonstration of lentiviral vector mediated correction of immunological and metabolic abnormalities in models of adenosine deaminase deficiency.** *Mol Ther* 2013.
190. Zhang L, Thrasher AJ, Gaspar HB: **Current progress on gene therapy for primary immunodeficiencies.** *Gene Ther* 2013, **20**:963-969.

191. Brenner MK, Heslop HE: **Adoptive T cell therapy of cancer.** *Curr Opin Immunol* 2010, **22**:251-257.
192. June CH, Blazar BR, Riley JL: **Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations.** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**:704-716.
193. Morgan RA, Dudley ME, Rosenberg SA: **Adoptive cell therapy: genetic modification to redirect effector cell specificity.** *Cancer J* 2010, **16**:336-341.
194. Schmitt TM, Ragnarsson GB, Greenberg PD: **T cell receptor gene therapy for cancer.** *Hum Gene Ther* 2009, **20**:1240-1248.
195. Pellegrini G, Rama P, Mavilio F, De Luca M: **Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy.** *J Pathol* 2009, **217**:217-228.
196. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G: **Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration.** *N Engl J Med* 2010, **363**:147-155.
197. Conti L, Cattaneo E: **Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities?** *Nat Rev Neurosci* 2010, **11**:176-187.
198. Lindvall O, Kokaia Z: **Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation?** *J Clin Invest* 2010, **120**:29-40.
199. Chien KR, Domian IJ, Parker KK: **Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine.** *Science* 2008, **322**:1494-1497.
200. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ: **Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays.** *Cell Stem Cell* 2008, **2**:313-319.
201. Singer NG, Caplan AI: **Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation.** *Annu Rev Pathol* 2011, **6**:457-478.
202. Davidson BL, McCray PB, Jr.: **Current prospects for RNA interference-based therapies.** *Nat Rev Genet* 2011, **12**:329-340.
203. Wong GK, Chiu AT: **Gene therapy, gene targeting and induced pluripotent stem cells: applications in monogenic disease treatment.** *Biotechnol Adv* 2010 **28**:715-724.
204. Remy S, Tesson L, Menoret S, Usal C, Scharenberg AM, Anegón I: **Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals.** *Transgenic Res* 2010, **19**:363-371.
205. Santiago Y, Chan E, Liu PQ, Orlando S, Zhang L, Urnov FD, Holmes MC, Guschin D, Waite A, Miller JC, et al: **Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:5809-5814.
206. Bushman F, Lewinski M, Ciuffi A, Barr S, Leipzig J, Hannenhalli S, Hoffmann C: **Genome-wide analysis of retroviral DNA integration.** *Nat Rev Microbiol* 2005, **3**:848-858.
207. Lewinski MK, Bushman FD: **Retroviral DNA integration--mechanism and consequences.** *Adv Genet* 2005, **55**:147-181.
208. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM: **Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration.** *Science* 2003, **300**:1749-1751.
209. Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM: **Development of a self-inactivating lentivirus vector.** *J Virol* 1998, **72**:8150-8157.
210. Wang GP, Ciuffi A, Leipzig J, Berry CC, Bushman FD: **HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications.** *Genome Res* 2007, **17**:1186-1194.
211. Laufs S, Guenechea G, Gonzalez-Murillo A, Zsuzsanna Nagy K, Luz Lozano M, Del Val C, Jonnakuty S, Hotz-Wagenblatt A, Jens Zeller W, Bueren JA, Fruehauf S: **Lentiviral vector integration sites in human NOD/SCID repopulating cells.** *J Gene Med* 2006, **8**:1197-1207.
212. Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F: **HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots.** *Cell* 2002, **110**:521-529.
213. Maetzig T, Galla M, Baum C, Schambach A: **Gammaretroviral vectors: biology, technology and application.** *Viruses* 2011, **3**:677-713.
214. Cavazzana-Calvo M, Fischer A: **Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet?** *J Clin Invest* 2007, **117**:1456-1465.

215. Gallay P, Swingler S, Aiken C, Trono D: **HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator.** *Cell* 1995, **80**:379-388.
216. von Schwedler U, Kornbluth RS, Trono D: **The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:6992-6996.
217. Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE: **Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors.** *Science* 1999, **283**:682-686.
218. Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L: **Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences.** *Nat Genet* 2000, **25**:217-222.
219. Guenechea G, Gan OI, Inamitsu T, Dorrell C, Pereira DS, Kelly M, Naldini L, Dick JE: **Transduction of human CD34+ CD38- bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors.** *Mol Ther* 2000, **1**:566-573.
220. Modlich U, Bohne J, Schmidt M, von Kalle C, Knoss S, Schambach A, Baum C: **Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity.** *Blood* 2006, **108**:2545-2553.
221. Ryu BY, Evans-Galea MV, Gray JT, Bodine DM, Persons DA, Nienhuis AW: **An experimental system for the evaluation of retroviral vector design to diminish the risk for proto-oncogene activation.** *Blood* 2007.
222. Hendrie PC, Huo Y, Stolitenko RB, Russell DW: **A rapid and quantitative assay for measuring neighboring gene activation by vector proviruses.** *Mol Ther* 2008, **16**:534-540.
223. Zychlinski D, Schambach A, Modlich U, Maetzig T, Meyer J, Grassman E, Mishra A, Baum C: **Physiological Promoters Reduce the Genotoxic Risk of Integrating Gene Vectors.** *Mol Ther* 2008.
224. Almarza E, Rio P, Meza NW, Aldea M, Agirre X, Guenechea G, Segovia JC, Bueren JA: **Characteristics of lentiviral vectors harboring the proximal promoter of the vav proto-oncogene: a weak and efficient promoter for gene therapy.** *Mol Ther* 2007, **15**:1487-1494.
225. Trono D: **Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent.** *Gene Ther* 2000, **7**:20-23.
226. Farson D, Witt R, McGuinness R, Dull T, Kelly M, Song J, Radeke R, Bukovsky A, Consiglio A, Naldini L: **A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors.** *Hum Gene Ther* 2001, **12**:981-997.
227. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D: **In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.** *Science* 1996, **272**:263-267.
228. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D: **Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery.** *J Virol* 1998, **72**:9873-9880.
229. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK: **Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:8033-8037.
230. Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Brady RO, Karlsson S, Schubert M: **Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high- titer HIV type 1 particles.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:15266-15271.
231. Check E: **A tragic setback.** *Nature* 2002, **420**:116-118.
232. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z: **Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells.** *Cell* 1997, **91**:501-510.
233. Izsvak Z, Chuah MK, Vandendriessche T, Ivics Z: **Efficient stable gene transfer into human cells by the Sleeping Beauty transposon vectors.** *Methods* 2009, **49**:287-297.
234. Ivics Z, Izsvak Z: **Transposons for gene therapy!** *Curr Gene Ther* 2006, **6**:593-607.

235. Oumard A, Qiao J, Jostock T, Li J, Bode J: **Recommended Method for Chromosome Exploitation: RMCE-based Cassette-exchange Systems in Animal Cell Biotechnology.** *Cytotechnology* 2006, **50**:93-108.
236. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA: **Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy.** *Nat Rev Genet* 2003, **4**:346-358.
237. Modlich U, Navarro S, Zychlinski D, Maetzig T, Knoess S, Brugman MH, Schambach A, Charrier S, Galy A, Thrasher AJ, et al: **Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors.** *Mol Ther* 2009, **17**:1919-1928.
238. Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Bartholomae CC, Ranzani M, Benedicenti F, Sergi LS, Ambrosi A, Ponzoni M, et al: **The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy.** *J Clin Invest* 2009, **119**:964-975.
239. Zychlinski D, Schambach A, Modlich U, Maetzig T, Meyer J, Grassman E, Mishra A, Baum C: **Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors.** *Mol Ther* 2008, **16**:718-725.
240. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, et al: **Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1.** *J Clin Invest* 2008, **118**:3132-3142.
241. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, Brugman MH, Pike-Overzet K, Chatters SJ, de Ridder D, et al: **Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients.** *J Clin Invest* 2008, **118**:3143-3150.
242. De Palma M, Montini E, Santoni de Sio FR, Benedicenti F, Gentile A, Medico E, Naldini L: **Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells.** *Blood* 2005, **105**:2307-2315.
243. Ellis J: **Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors.** *Hum Gene Ther* 2005, **16**:1241-1246.
244. Brown BD, Gentner B, Cantore A, Colleoni S, Amendola M, Zingale A, Baccarini A, Lazzari G, Galli C, Naldini L: **Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**:1457-1467.
245. Gentner B, Visigalli I, Hiramatsu H, Lechman E, Ungari S, Giustacchini A, Schira G, Amendola M, Quattrini A, Martino S, et al: **Identification of hematopoietic stem cell-specific miRNAs enables gene therapy of globoid cell leukodystrophy.** *Sci Transl Med* 2010, **2**:58ra84.
246. Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC: **Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms.** *Gene Ther* 2004, **11 Suppl 1**:S10-17.
247. Masat E, Pavani G, Mingozzi F: **Humoral immunity to AAV vectors in gene therapy: challenges and potential solutions.** *Discov Med* 2013, **15**:379-389.
248. Faust SM, Bell P, Cutler BJ, Ashley SN, Zhu Y, Rabinowitz JE, Wilson JM: **CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection.** *J Clin Invest* 2013, **123**:2994-3001.
249. Guijarro-Munoz I, Compte M, Alvarez-Vallina L, Sanz L: **Antibody gene therapy: getting closer to clinical application?** *Curr Gene Ther* 2013, **13**:282-290.
250. Annoni A, Goudy K, Akbarpour M, Naldini L, Roncarolo MG: **Immune responses in liver-directed lentiviral gene therapy.** *Transl Res* 2013, **161**:230-240.
251. Capecchi MR: **Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century.** *Nat Rev Genet* 2005, **6**:507-512.
252. Marcaida MJ, Munoz IG, Blanco FJ, Prieto J, Montoya G: **Homing endonucleases: from basics to therapeutic applications.** *Cell Mol Life Sci*, **67**:727-748.
253. Latt SA: **Sister chromatid exchange formation.** *Annu Rev Genet* 1981, **15**:11-55.
254. Rudin N, Sugarman E, Haber JE: **Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* 1989, **122**:519-534.

255. Plessis A, Perrin A, Haber JE, Dujon B: **Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus.** *Genetics* 1992, **130**:451-460.
256. Rouet P, Smih F, Jasin M: **Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease.** *Mol Cell Biol* 1994, **14**:8096-8106.
257. Choulika A, Perrin A, Dujon B, Nicolas JF: **Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:1968-1973.
258. Agarwal S, Tafel AA, Kanaar R: **DNA double-strand break repair and chromosome translocations.** *DNA Repair (Amst)* 2006, **5**:1075-1081.
259. Wyman C, Kanaar R: **DNA double-strand break repair: all's well that ends well.** *Annu Rev Genet* 2006, **40**:363-383.
260. Lieber MR: **The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway.** *Annu Rev Biochem* 2010, **79**:181-211.
261. Fattah FJ, Lichter NF, Fattah KR, Oh S, Hendrickson EA: **Ku70, an essential gene, modulates the frequency of rAAV-mediated gene targeting in human somatic cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:8703-8708.
262. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S: **Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells.** *EMBO J* 1998, **17**:5497-5508.
263. Delacote F, Lopez BS: **Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model.** *Cell Cycle* 2008, **7**:33-38.
264. Cary RB, Peterson SR, Wang J, Bear DG, Bradbury EM, Chen DJ: **DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:4267-4272.
265. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J: **Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair.** *Nature* 2001, **412**:607-614.
266. Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR: **Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies.** *EMBO J* 1997, **16**:5098-5112.
267. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR: **Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination.** *Cell* 2002, **108**:781-794.
268. Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, Lieber MR: **Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells.** *Nature* 1997, **388**:492-495.
269. Porteus MH, Carroll D: **Gene targeting using zinc finger nucleases.** *Nat Biotechnol* 2005, **23**:967-973.
270. Beumer K, Bhattacharyya G, Bibikova M, Trautman JK, Carroll D: **Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases.** *Genetics* 2006, **172**:2391-2403.
271. Beumer KJ, Trautman JK, Bozas A, Liu JL, Rutter J, Gall JG, Carroll D: **Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:19821-19826.
272. Carbery ID, Ji D, Harrington A, Brown V, Weinstein EJ, Liaw L, Cui X: **Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases.** *Genetics* 2010, **186**:451-459.
273. Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, Katibah GE, Amora R, Hocking TD, Zhang L, Rebar EJ, et al: **Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:702-708.
274. Foley JE, Yeh JR, Maeder ML, Reyon D, Sander JD, Peterson RT, Joung JK: **Rapid mutation of endogenous zebrafish genes using zinc finger nucleases made by Oligomerized Pool Engineering (OPEN).** *PLoS One* 2009, **4**:e4348.

275. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, et al: **Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases.** *Science* 2009, **325**:433.
276. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, Serikawa T: **Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases.** *PLoS One* 2010, **5**:e8870.
277. Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA: **Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:695-701.
278. Kim HJ, Lee HJ, Kim H, Cho SW, Kim JS: **Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly.** *Genome Res* 2009, **19**:1279-1288.
279. Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee YL, Kim KA, Ando D, Urnov FD, Galli C, Gregory PD, et al: **Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**:1298-1306.
280. Brunet E, Simsek D, Tomishima M, DeKolver R, Choi VM, Gregory P, Urnov F, Weinstock DM, Jasin M: **Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:10620-10625.
281. Lee HJ, Kim E, Kim JS: **Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases.** *Genome Res* 2010, **20**:81-89.
282. Petolino JF, Worden A, Curlee K, Connell J, Strange Moynahan TL, Larsen C, Russell S: **Zinc finger nuclease-mediated transgene deletion.** *Plant Mol Biol* 2010, **73**:617-628.
283. Solli C, Pars K, Cornu TI, Thibodeau-Beganny S, Maeder ML, Joung JK, Heilbronn R, Cathomen T: **Autonomous zinc-finger nuclease pairs for targeted chromosomal deletion.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:8269-8276.
284. Orlando SJ, Santiago Y, DeKolver RC, Freyvert Y, Boydston EA, Moehle EA, Choi VM, Gopalan SM, Lou JF, Li J, et al: **Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:e152.
285. San Filippo J, Sung P, Klein H: **Mechanism of eukaryotic homologous recombination.** *Annu Rev Biochem* 2008, **77**:229-257.
286. Bernstein KA, Rothstein R: **At loose ends: resealing a double-strand break.** *Cell* 2009, **137**:807-810.
287. Johnson RD, Jasin M: **Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells.** *Biochem Soc Trans* 2001, **29**:196-201.
288. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC: **Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases.** *Nature* 2005, **435**:646-651.
289. Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKolver RC, Katibah GE, Amora R, Boydston EA, Zeitler B, et al: **Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases.** *Nat Biotechnol* 2009, **27**:851-857.
290. Zou J, Maeder ML, Mali P, Pruett-Miller SM, Thibodeau-Beganny S, Chou BK, Chen G, Ye Z, Park IH, Daley GQ, et al: **Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells.** *Cell Stem Cell* 2009, **5**:97-110.
291. Smithies O: **Forty years with homologous recombination.** *Nat Med* 2001, **7**:1083-1086.
292. Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH: **Manipulating the mammalian genome by homologous recombination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:8403-8410.
293. Moehle EA, Rock JM, Lee YL, Jouvenot Y, DeKolver RC, Gregory PD, Urnov FD, Holmes MC: **Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:3055-3060.
294. Andersen MS, Sorensen CB, Bolund L, Jensen TG: **Mechanisms underlying targeted gene correction using chimeric RNA/DNA and single-stranded DNA oligonucleotides.** *J Mol Med (Berl)* 2002, **80**:770-781.

295. Olsen PA, Solhaug A, Booth JA, Gelazauskaite M, Krauss S: **Cellular responses to targeted genomic sequence modification using single-stranded oligonucleotides and zinc-finger nucleases.** *DNA Repair (Amst)* 2009, **8**:298-308.
296. Tsuchiya H, Harashima H, Kamiya H: **Increased SFHR gene correction efficiency with sense single-stranded DNA.** *J Gene Med* 2005, **7**:486-493.
297. Zayed H, McIvor RS, Wiest DL, Blazar BR: **In vitro functional correction of the mutation responsible for murine severe combined immune deficiency by small fragment homologous replacement.** *Hum Gene Ther* 2006, **17**:158-166.
298. Hansen ME, Bentin T, Nielsen PE: **High-affinity triplex targeting of double stranded DNA using chemically modified peptide nucleic acid oligomers.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:4498-4507.
299. Coura Rdos S, Nardi NB: **The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy.** *Viral J* 2007, **4**:99.
300. Igoucheva O, Alexeev V, Anni H, Rubin E: **Oligonucleotide-mediated gene targeting in human hepatocytes: implications of mismatch repair.** *Oligonucleotides* 2008, **18**:111-122.
301. Bertoni C, Rustagi A, Rando TA: **Enhanced gene repair mediated by methyl-CpG-modified single-stranded oligonucleotides.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:7468-7482.
302. Chin JY, Glazer PM: **Repair of DNA lesions associated with triplex-forming oligonucleotides.** *Mol Carcinog* 2009, **48**:389-399.
303. Wang G, Seidman MM, Glazer PM: **Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair.** *Science* 1996, **271**:802-805.
304. Vasileva A, Linden RM, Jessberger R: **Homologous recombination is required for AAV-mediated gene targeting.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**:3345-3360.
305. Leclerc X, Danos O, Scherman D, Kichler A: **A comparison of synthetic oligodeoxynucleotides, DNA fragments and AAV-1 for targeted episomal and chromosomal gene repair.** *BMC Biotechnol* 2009, **9**:35.
306. Chamberlain JR, Deyle DR, Schwarze U, Wang P, Hirata RK, Li Y, Byers PH, Russell DW: **Gene targeting of mutant COL1A2 alleles in mesenchymal stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta.** *Mol Ther* 2008, **16**:187-193.
307. Khan IF, Hirata RK, Wang PR, Li Y, Kho J, Nelson A, Huo Y, Zavaljevski M, Ware C, Russell DW: **Engineering of human pluripotent stem cells by AAV-mediated gene targeting.** *Mol Ther*, **18**:1192-1199.
308. Mitsui K, Suzuki K, Aizawa E, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K: **Gene targeting in human pluripotent stem cells with adeno-associated virus vectors.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **388**:711-717.
309. Liu X, Yan Z, Luo M, Zak R, Li Z, Driskell RR, Huang Y, Tran N, Engelhardt JF: **Targeted correction of single-base-pair mutations with adeno-associated virus vectors under nonselective conditions.** *J Virol* 2004, **78**:4165-4175.
310. Vasileva A, Jessberger R: **Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting.** *Nat Rev Microbiol* 2005, **3**:837-847.
311. Gellhaus K, Cornu TI, Heilbronn R, Cathomen T: **Fate of recombinant adeno-associated viral vector genomes during DNA double-strand break-induced gene targeting in human cells.** *Hum Gene Ther*, **21**:543-553.
312. Porteus MH, Baltimore D: **Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells.** *Science* 2003, **300**:763.
313. Jensen NM, Dalsgaard T, Jakobsen M, Nielsen RR, Sorensen CB, Bolund L, Jensen TG: **An update on targeted gene repair in mammalian cells: methods and mechanisms.** *J Biomed Sci*, **18**:10.
314. Grizot S, Epinat JC, Thomas S, Duclert A, Rolland S, Paques F, Duchateau P: **Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:2006-2018.

315. Paques F, Duchateau P: **Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy.** *Curr Gene Ther* 2007, **7**:49-66.
316. Chevalier BS, Stoddard BL: **Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:3757-3774.
317. Arnould S, Delenda C, Grizot S, Desseaux C, Paques F, Silva GH, Smith J: **The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy.** *Protein Eng Des Sel*, **24**:27-31.
318. Jurica MS, Monnat RJ, Jr., Stoddard BL: **DNA recognition and cleavage by the LAGLIDADG homing endonuclease I-CreI.** *Mol Cell* 1998, **2**:469-476.
319. Epinat JC, Arnould S, Chames P, Rochaix P, Desfontaines D, Puzin C, Patin A, Zanghellini A, Paques F, Lacroix E: **A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:2952-2962.
320. Doyon JB, Pattanayak V, Meyer CB, Liu DR: **Directed evolution and substrate specificity profile of homing endonuclease I-SceI.** *J Am Chem Soc* 2006, **128**:2477-2484.
321. Chen Z, Zhao H: **A highly sensitive selection method for directed evolution of homing endonucleases.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:e154.
322. Grizot S, Smith J, Daboussi F, Prieto J, Redondo P, Merino N, Villate M, Thomas S, Lemaire L, Montoya G, et al: **Efficient targeting of a SCID gene by an engineered single-chain homing endonuclease.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:5405-5419.
323. Mussolino C, Cathomen T: **TALE nucleases: tailored genome engineering made easy.** *Curr Opin Biotechnol* 2012, **23**:644-650.
324. Boch J, Bonas U: **Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function.** *Annu Rev Phytopathol*, **48**:419-436.
325. Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N: **Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors.** *Science*, **335**:720-723.
326. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U: **Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors.** *Science* 2009, **326**:1509-1512.
327. Mussolino C, Cathomen T: **TALE nucleases: tailored genome engineering made easy.** *Curr Opin Biotechnol*.
328. Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, et al: **Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**:731-734.
329. Bhaya D, Davison M, Barrangou R: **CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation.** *Annu Rev Genet* 2011, **45**:273-297.
330. Al-Attar S, Westra ER, van der Oost J, Brouns SJ: **Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes.** *Biol Chem* 2011, **392**:277-289.
331. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA: **RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea.** *Nature* 2012, **482**:331-338.
332. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, et al: **Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems.** *Nat Rev Microbiol* 2011, **9**:467-477.
333. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV: **A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action.** *Biol Direct* 2006, **1**:7.
334. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E: **CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.** *Nature* 2011, **471**:602-607.
335. Hale CR, Majumdar S, Elmore J, Pfister N, Compton M, Olson S, Resch AM, Glover CV, 3rd, Graveley BR, Terns RM, Terns MP: **Essential features and rational design of CRISPR RNAs**

- that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. *Mol Cell* 2012, **45**:292-302.
336. Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM, Terns MP: **RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex.** *Cell* 2009, **139**:945-956.
 337. Jore MM, Lundgren M, van Duijn E, Bultema JB, Westra ER, Waghmare SP, Wiedenheft B, Pul U, Wurm R, Wagner R, et al: **Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade.** *Nat Struct Mol Biol* 2011, **18**:529-536.
 338. Gasiunas G, Siksnys V: **RNA-dependent DNA endonuclease Cas9 of the CRISPR system: Holy Grail of genome editing?** *Trends Microbiol* 2013.
 339. Karvelis T, Gasiunas G, Miksys A, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V: **crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in Streptococcus thermophilus.** *RNA Biol* 2013, **10**:841-851.
 340. Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E: **The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems.** *RNA Biol* 2013, **10**:726-737.
 341. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E: **A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.** *Science* 2012, **337**:816-821.
 342. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V: **Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:E2579-2586.
 343. Barrangou R: **RNA-mediated programmable DNA cleavage.** *Nat Biotechnol* 2012, **30**:836-838.
 344. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R: **One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering.** *Cell* 2013, **153**:910-918.
 345. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F: **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.** *Science* 2013, **339**:819-823.
 346. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM: **RNA-guided human genome engineering via Cas9.** *Science* 2013, **339**:823-826.
 347. Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ, Thomson JA: **Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from Neisseria meningitidis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:15644-15649.
 348. Mussolino C, Cathomen T: **RNA guides genome engineering.** *Nat Biotechnol* 2013, **31**:208-209.
 349. Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ, Bao G: **CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity.** *Nucleic Acids Res* 2013.
 350. Chandrasegaran S, Smith J: **Chimeric restriction enzymes: what is next?** *Biol Chem* 1999, **380**:841-848.
 351. Pabo CO, Peisach E, Grant RA: **Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins.** *Annu Rev Biochem* 2001, **70**:313-340.
 352. Smith J, Bibikova M, Whitby FG, Reddy AR, Chandrasegaran S, Carroll D: **Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**:3361-3369.
 353. Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, Chandrasegaran S: **Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:289-297.
 354. Handel EM, Alwin S, Cathomen T: **Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity.** *Mol Ther* 2009, **17**:104-111.
 355. Shimizu Y, Bhakta MS, Segal DJ: **Restricted spacer tolerance of a zinc finger nuclease with a six amino acid linker.** *Bioorg Med Chem Lett* 2009, **19**:3970-3972.
 356. Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, et al: **An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**:778-785.

357. Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D: **Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases.** *Science* 2003, **300**:764.
358. Cathomen T, Joung JK: **Zinc-finger nucleases: the next generation emerges.** *Mol Ther* 2008, **16**:1200-1207.
359. Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, Chandrasegaran S: **Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:5978-5990.
360. Beerli RR, Barbas CF, 3rd: **Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors.** *Nat Biotechnol* 2002, **20**:135-141.
361. Perez-Pinera P, Ousterout DG, Gersbach CA: **Advances in targeted genome editing.** *Curr Opin Chem Biol* 2012, **16**:268-277.
362. Gonzalez B, Schwimmer LJ, Fuller RP, Ye Y, Asawapornmongkol L, Barbas CF, 3rd: **Modular system for the construction of zinc-finger libraries and proteins.** *Nat Protoc* 2010, **5**:791-810.
363. Gupta A, Christensen RG, Rayla AL, Lakshmanan A, Stormo GD, Wolfe SA: **An optimized two-finger archive for ZFN-mediated gene targeting.** *Nat Methods* 2012, **9**:588-590.
364. Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, et al: **Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification.** *Mol Cell* 2008, **31**:294-301.
365. Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, Curtin SJ, Blackburn JS, Thibodeau-Beganny S, Qi Y, et al: **Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA).** *Nat Methods* 2011, **8**:67-69.
366. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR: **Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection.** *Nat Methods*, **8**:765-770.
367. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S: **Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:1156-1160.
368. Carroll D: **Genome engineering with zinc-finger nucleases.** *Genetics* 2011, **188**:773-782.
369. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD: **Genome editing with engineered zinc finger nucleases.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**:636-646.
370. Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, Crooks GM, Kohn DB, Gregory PD, Holmes MC, Cannon PM: **Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo.** *Nat Biotechnol* 2010, **28**:839-847.
371. Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL, et al: **Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:808-816.
372. Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, Jamieson AC, McCaffrey AP: **Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs.** *Mol Ther* 2010, **18**:947-954.
373. DeKolver RC, Choi VM, Moehle EA, Paschon DE, Hockemeyer D, Meijsing SH, Sancak Y, Cui X, Steine EJ, Miller JC, et al: **Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome.** *Genome Res* 2010, **20**:1133-1142.
374. Zou J, Sweeney CL, Chou BK, Choi U, Pan J, Wang H, Doney SN, Cheng L, Malech HL: **Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting.** *Blood* 2011, **117**:5561-5572.
375. Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, Haddad B, Khayter C, Yeo DT, Goodwin MJ, Hawkins JS, Ramirez CL, Batista LF, et al: **In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases.** *Stem Cells* 2011, **29**:1717-1726.
376. Zou J, Mali P, Huang X, Doney SN, Cheng L: **Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease.** *Blood* 2011, **118**:4599-4608.

377. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, Miranda E, Ordonez A, Hannan NR, Rouhani FJ, et al: **Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells.** *Nature* 2011, **478**:391-394.
378. Soldner F, Laganier J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, Alagappan R, Khurana V, Golbe LI, Myers RH, Lindquist S, et al: **Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations.** *Cell* 2011, **146**:318-331.
379. Lee HJ, Kweon J, Kim E, Kim S, Kim JS: **Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases.** *Genome Res* 2012, **22**:539-548.
380. Certo MT, Ryu BY, Annis JE, Garibov M, Jarjour J, Rawlings DJ, Scharenberg AM: **Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints.** *Nat Methods* 2011, **8**:671-676.
381. Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, et al: **Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:12013-12017.
382. Tesson L, Usal C, Menoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, Santiago Y, Vincent AI, Meng X, Zhang L, et al: **Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**:695-696.
383. Meyer M, de Angelis MH, Wurst W, Kuhn R: **Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:15022-15026.
384. Cui X, Ji D, Fisher DA, Wu Y, Briner DM, Weinstein EJ: **Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**:64-67.
385. Flisikowska T, Thorey IS, Offner S, Ros F, Lifke V, Zeitler B, Rottmann O, Vincent A, Zhang L, Jenkins S, et al: **Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases.** *PLoS One* 2011, **6**:e21045.
386. Papapetrou EP, Zoumbos NC, Athanassiadou A: **Genetic modification of hematopoietic stem cells with nonviral systems: past progress and future prospects.** *Gene Ther* 2005, **12 Suppl 1**:S118-130.
387. Lei Y, Lee CL, Joo KI, Zarzar J, Liu Y, Dai B, Fox V, Wang P: **Gene editing of human embryonic stem cells via an engineered baculoviral vector carrying zinc-finger nucleases.** *Mol Ther* 2011, **19**:942-950.
388. Goncalves MA, de Vries AA: **Adenovirus: from foe to friend.** *Rev Med Virol* 2006, **16**:167-186.
389. Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, Recchia A, Cathomen T, Goncalves MA: **Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**:e63.
390. Hendrie PC, Russell DW: **Gene targeting with viral vectors.** *Mol Ther* 2005, **12**:9-17.
391. Gellhaus K, Cornu TI, Heilbronn R, Cathomen T: **Fate of recombinant adeno-associated viral vector genomes during DNA double-strand break-induced gene targeting in human cells.** *Hum Gene Ther* 2010, **21**:543-553.
392. Asuri P, Bartel MA, Vazin T, Jang JH, Wong TB, Schaffer DV: **Directed evolution of adeno-associated virus for enhanced gene delivery and gene targeting in human pluripotent stem cells.** *Mol Ther* 2012, **20**:329-338.
393. Hirsch ML, Green L, Porteus MH, Samulski RJ: **Self-complementary AAV mediates gene targeting and enhances endonuclease delivery for double-strand break repair.** *Gene Ther* 2010, **17**:1175-1180.
394. Ellis BL, Hirsch ML, Porter SN, Samulski RJ, Porteus MH: **Zinc-finger nuclease-mediated gene correction using single AAV vector transduction and enhancement by Food and Drug Administration-approved drugs.** *Gene Ther* 2012.
395. Sun N, Abil Z, Zhao H: **Recent advances in targeted genome engineering in mammalian systems.** *Biotechnol J* 2012, **7**:1074-1087.
396. Elliott B, Jasin M: **Double-strand breaks and translocations in cancer.** *Cell Mol Life Sci* 2002, **59**:373-385.

397. Richardson C, Jasin M: **Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks.** *Nature* 2000, **405**:697-700.
398. Mussolino C, Cathomen T: **On target? Tracing zinc-finger-nuclease specificity.** *Nat Methods* 2011, **8**:725-726.
399. Cornu TI, Thibodeau-Beganny S, Guhl E, Alwin S, Eichtinger M, Joung JK, Cathomen T: **DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases.** *Mol Ther* 2008, **16**:352-358.
400. Blackwell TK, Weintraub H: **Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection.** *Science* 1990, **250**:1104-1110.
401. Tuerk C, Gold L: **Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase.** *Science* 1990, **249**:505-510.
402. Szczepek M, Brondani V, Buchel J, Serrano L, Segal DJ, Cathomen T: **Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**:786-793.
403. Pruett-Miller SM, Reading DW, Porter SN, Porteus MH: **Attenuation of zinc finger nuclease toxicity by small-molecule regulation of protein levels.** *PLoS Genet* 2009, **5**:e1000376.
404. Fontes A, Lakshmipathy U: **Advances in genetic modification of pluripotent stem cells.** *Biotechnol Adv* 2013.
405. Carroll D: **Zinc-finger nucleases: a panoramic view.** *Curr Gene Ther* 2010, **11**:2-10.
406. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR: **Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.** *Cell* 1996, **86**:367-377.
407. Rottman JB, Ganley KP, Williams K, Wu L, Mackay CR, Ringler DJ: **Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection.** *Am J Pathol* 1997, **151**:1341-1351.
408. Lim JK, Glass WG, McDermott DH, Murphy PM: **CCR5: no longer a "good for nothing" gene--chemokine control of West Nile virus infection.** *Trends Immunol* 2006, **27**:308-312.
409. Irion S, Luche H, Gadue P, Fehling HJ, Kennedy M, Keller G: **Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**:1477-1482.
410. Henckaerts E, Linden RM: **Adeno-associated virus: a key to the human genome?** *Future Virol* 2010, **5**:555-574.
411. Ramachandra CJ, Shahbazi M, Kwang TW, Choudhury Y, Bak XY, Yang J, Wang S: **Efficient recombinase-mediated cassette exchange at the AAVS1 locus in human embryonic stem cells using baculoviral vectors.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:e107.
412. Smith JR, Maguire S, Davis LA, Alexander M, Yang F, Chandran S, French-Constant C, Pedersen RA: **Robust, persistent transgene expression in human embryonic stem cells is achieved with AAVS1-targeted integration.** *Stem Cells* 2008, **26**:496-504.
413. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, et al: **Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population.** *Nature* 2008, **453**:524-528.
414. Ogata T, Kozuka T, Kanda T: **Identification of an insulator in AAVS1, a preferred region for integration of adeno-associated virus DNA.** *J Virol* 2003, **77**:9000-9007.
415. Evans MJ, Kaufman MH: **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.** *Nature* 1981, **292**:154-156.
416. Martin GR: **Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, **78**:7634-7638.
417. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM: **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.** *Science* 1998, **282**:1145-1147.
418. Reubinfon BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A: **Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro.** *Nat Biotechnol* 2000, **18**:399-404.

419. Solter D: **From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research.** *Nat Rev Genet* 2006, **7**:319-327.
420. Pessina A, Gribaldo L: **The key role of adult stem cells: therapeutic perspectives.** *Curr Med Res Opin* 2006, **22**:2287-2300.
421. Koch P, Kokaia Z, Lindvall O, Brustle O: **Emerging concepts in neural stem cell research: autologous repair and cell-based disease modelling.** *Lancet Neurol* 2009, **8**:819-829.
422. Pappa KI, Anagnou NP: **Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum?** *Regen Med* 2009, **4**:423-433.
423. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT, Plath K: **Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:2883-2888.
424. Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu X, Lin J, Chen G, Zou J, Cheng L: **Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts.** *Stem Cells* 2008, **26**:1998-2005.
425. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ: **Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors.** *Nature* 2008, **451**:141-146.
426. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S: **Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures.** *Nat Protoc* 2007, **2**:3081-3089.
427. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, et al: **Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.** *Science* 2007, **318**:1917-1920.
428. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA: **Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences.** *Science* 2009, **324**:797-801.
429. Briggs R, King TJ: **Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1952, **38**:455-463.
430. Gurdon JB: **The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles.** *J Embryol Exp Morphol* 1962, **10**:622-640.
431. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH: **Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.** *Nature* 1997, **385**:810-813.
432. Cheng L: **More new lines of human parthenogenetic embryonic stem cells.** *Cell Res* 2008, **18**:215-217.
433. Yu J, Thomson JA: **Pluripotent stem cell lines.** *Genes Dev* 2008, **22**:1987-1997.
434. Chang CW, Lai YS, Pawlik KM, Liu K, Sun CW, Li C, Schoeb TR, Townes TM: **Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells.** *Stem Cells* 2009, **27**:1042-1049.
435. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K: **Induced pluripotent stem cells generated without viral integration.** *Science* 2008, **322**:945-949.
436. Phillips JL, Hegge J, Wolff JA, Samulski RJ, Asokan A: **Systemic gene transfer to skeletal muscle using reengineered AAV vectors.** *Methods Mol Biol* 2011, **709**:141-151.
437. Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, Panetta NJ, Chen ZY, Robbins RC, Kay MA, et al: **A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells.** *Nat Methods* 2010, **7**:197-199.
438. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, et al: **piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells.** *Nature* 2009, **458**:766-770.
439. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, et al: **Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA.** *Cell Stem Cell* 2010, **7**:618-630.
440. Li Z, Rana TM: **Using microRNAs to enhance the generation of induced pluripotent stem cells.** *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2012, **Chapter 4**:Unit 4A 4.

441. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS: **Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:472-476.
442. Han J, Sachdev PS, Sidhu KS: **A combined epigenetic and non-genetic approach for reprogramming human somatic cells.** *PLoS One* 2010, **5**:e12297.
443. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R: **Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**:1177-1181.
444. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, et al: **Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution.** *Cell Stem Cell* 2007, **1**:55-70.
445. Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch R: **Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells.** *Cell Stem Cell* 2008, **2**:151-159.
446. Wernig M, Lengner CJ, Hanna J, Lodato MA, Steine E, Foreman R, Staerk J, Markoulaki S, Jaenisch R: **A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:916-924.
447. Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K: **Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse.** *Cell Stem Cell* 2008, **2**:230-240.
448. Hockemeyer D, Soldner F, Cook EG, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R: **A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**:346-353.
449. Maherali N, Hochedlinger K: **Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**:595-605.
450. Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A: **Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon.** *Nat Methods* 2009, **6**:363-369.
451. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, et al: **Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors.** *Cell* 2009, **136**:964-977.
452. Papapetrou EP, Sadelain M: **Generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells with an excisable single polycistronic vector.** *Nat Protoc* 2011, **6**:1251-1273.
453. Sommer CA, Mostoslavsky G: **Experimental approaches for the generation of induced pluripotent stem cells.** *Stem Cell Res Ther* 2010, **1**:26.
454. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S: **Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors.** *Science* 2008, **322**:949-953.
455. Mali P, Chou BK, Yen J, Ye Z, Zou J, Dowey S, Brodsky RA, Ohm JE, Yu W, Baylin SB, et al: **Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes.** *Stem Cells* 2010, **28**:713-720.
456. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M: **Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome.** *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009, **85**:348-362.
457. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, et al: **Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:381-384.
458. Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, Hur J, Lee EJ, Roh TY, Chu IS, Leem SH, et al: **Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation.** *Blood* 2010, **116**:386-395.
459. Parameswaran S, Balasubramanian S, Rao MS, Ahmad I: **Concise review: non-cell autonomous reprogramming: a nucleic acid-free approach to induction of pluripotency.** *Stem Cells*, **29**:1013-1020.

460. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA: **Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:1269-1275.
461. Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K: **Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells.** *Curr Biol* 2008, **18**:890-894.
462. Somers A, Jean JC, Sommer CA, Omari A, Ford CC, Mills JA, Ying L, Sommer AG, Jean JM, Smith BW, et al: **Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette.** *Stem Cells* 2010, **28**:1728-1740.
463. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, Zhang Y, Yang W, Gruber PJ, Epstein JA, Morrissey EE: **Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency.** *Cell Stem Cell* 2011, **8**:376-388.
464. Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K: **A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**:340-345.
465. Si-Tayeb K, Noto FK, Sepac A, Sedlic F, Bosnjak ZJ, Lough JW, Duncan SA: **Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors.** *BMC Dev Biol* 2010, **10**:81.
466. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, Nishikawa S, Tanemura M, Mimori K, Tanaka F, et al: **Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs.** *Cell Stem Cell* 2011, **8**:633-638.
467. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K: **Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells.** *Science* 2005, **309**:1369-1373.
468. Hanna J, Markoulaki S, Mitalipova M, Cheng AW, Cassady JP, Staerk J, Carey BW, Lengner CJ, Foreman R, Love J, et al: **Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:513-524.
469. Liu J, Verma PJ, Evans-Galea MV, Delatycki MB, Michalska A, Leung J, Crombie D, Sarsero JP, Williamson R, Dottori M, Pebay A: **Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients.** *Stem Cell Rev* 2011, **7**:703-713.
470. Howden SE, Gore A, Li Z, Fung HL, Nisler BS, Nie J, Chen G, McIntosh BE, Gulbranson DR, Diol NR, et al: **Genetic correction and analysis of induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:6537-6542.
471. Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, Ang YS, Schaniel C, Lee DF, Yang L, Kaplan AD, Adler ED, Rozov R, et al: **Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome.** *Nature* 2010, **465**:808-812.
472. Kunisato A, Wakatsuki M, Shinba H, Ota T, Ishida I, Nagao K: **Direct generation of induced pluripotent stem cells from human nonmobilized blood.** *Stem Cells Dev* 2010, **20**:159-168.
473. Kunisato A, Wakatsuki M, Kodama Y, Shinba H, Ishida I, Nagao K: **Generation of induced pluripotent stem cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells.** *Stem Cells Dev* 2009, **19**:229-238.
474. Liu T, Zou G, Gao Y, Zhao X, Wang H, Huang Q, Jiang L, Guo L, Cheng W: **High efficiency of reprogramming CD34(+) cells derived from human amniotic fluid into induced pluripotent stem cells with Oct4.** *Stem Cells Dev* 2012, **21**:2322-2332.
475. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimuwu O, Richter L, Zhang J, et al: **Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures.** *Cell Stem Cell* 2009, **5**:111-123.
476. Deng J, Shoemaker R, Xie B, Gore A, LeProust EM, Antosiewicz-Bourget J, Egli D, Maherali N, Park IH, Yu J, et al: **Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming.** *Nat Biotechnol* 2009, **27**:353-360.
477. Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, et al: **Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores**

- distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 2009, **41**:1350-1353.
478. Ghosh Z, Wilson KD, Wu Y, Hu S, Quertermous T, Wu JC: **Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells.** *PLoS One* 2010, **5**:e8975.
479. Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR: **Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells.** *PLoS One* 2009, **4**:e7076.
480. Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, Ziller M, Croft GF, Amoroso MW, Oakley DH, et al: **Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines.** *Cell* 2011, **144**:439-452.
481. Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, Young RA: **Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells.** *Cell Stem Cell* 2010, **7**:249-257.
482. Newman AM, Cooper JB: **Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells.** *Cell Stem Cell* 2010, **7**:258-262.
483. Xu D, Alipio Z, Fink LM, Adcock DM, Yang J, Ward DC, Ma Y: **Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:808-813.
484. Baum C, von Kalle C, Staal FJ, Li Z, Fehse B, Schmidt M, Weerkamp F, Karlsson S, Wagemaker G, Williams DA: **Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences.** *Mol Ther* 2004, **9**:5-13.
485. Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Ponzoni M, Bartholomae C, Sergi L, Benedicenti F, Ambrosi A, Di Serio C, et al: **Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration.** *Nat Biotechnol* 2006, **24**:687-696.
486. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R: **Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin.** *Science* 2007, **318**:1920-1923.
487. Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, Canto I, Giorgetti A, Israel MA, Kiskinis E, et al: **Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells.** *Nature* 2011, **471**:63-67.
488. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, Lynch C, Harness JV, Lee S, Barrero MJ, et al: **Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture.** *Cell Stem Cell* 2011, **8**:106-118.
489. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S, et al: **Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells.** *Nature* 2011, **471**:68-73.
490. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Birdsall-Maller I, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, Leitter EH: **Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice.** *J Immunol* 1995, **154**:180-191.
491. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, et al: **Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells.** *J Immunol* 2005, **174**:6477-6489.
492. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, et al: **NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells.** *Blood* 2002, **100**:3175-3182.
493. Albella B, Segovia JC, Guenechea G, Pragnell IB, Bueren JA: **Preserved long-term repopulation and differentiation properties of hematopoietic grafts subjected to ex vivo expansion with stem cell factor and interleukin 11.** *Transplantation* 1999, **67**:1348-1357.

494. Guenechea G, Segovia JC, Albella B, Lamana M, Ramirez M, Regidor C, Fernandez MN, Bueren JA: **Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells.** *Blood* 1999, **93**:1097-1105.
495. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH: **Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells.** *J Immunol* 1984, **133**:157-165.
496. Tindle RW, Nichols RA, Chan L, Campana D, Catovsky D, Birnie GD: **A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognises myeloblasts and non-B non-T lymphoblasts in acute leukaemias and CGL blast crises, and reacts with immature cells in normal bone marrow.** *Leuk Res* 1985, **9**:1-9.
497. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID: **Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors.** *Blood* 1986, **67**:842-845.
498. Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC, Loken MR: **Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow.** *Exp Hematol* 1987, **15**:10-17.
499. Aran B, Rodriguez-Piza I, Raya A, Consiglio A, Munoz Y, Barri PN, Izpisua JC, Veiga A: **Derivation of human embryonic stem cells at the Center of Regenerative Medicine in Barcelona.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010, **46**:356-366.
500. Loeb JE, Cordier WS, Harris ME, Weitzman MD, Hope TJ: **Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy.** *Hum Gene Ther* 1999, **10**:2295-2305.
501. Tolar J, Becker PS, Clapp DW, Hanenberg H, de Heredia CD, Kiem HP, Navarro S, Qasba P, Rio P, Schmidt M, et al: **Gene Therapy for Fanconi Anemia: One Step Closer to the Clinic.** *Hum Gene Ther* 2012.
502. Egelhofer M, Brandenburg G, Martinius H, Schult-Dietrich P, Melikyan G, Kunert R, Baum C, Choi I, Alexandrov A, von Laer D: **Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides.** *J Virol* 2004, **78**:568-575.
503. Schambach A, Böhne J, Baum C, Hermann FG, Egerer L, von Laer D, Girolglou T: **Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression.** *Gene Ther* 2006, **13**:641-645.
504. Papapetrou EP, Lee G, Malani N, Setty M, Riviere I, Tirunagari LM, Kadota K, Roth SL, Giardina P, Viale A, et al: **Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**:73-78.
505. Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, Morel P, Lou J, Trono D: **Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes.** *Mol Ther* 2000, **2**:404-414.
506. Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, Alt FW, Murphy GJ, Kotton DN, Mostoslavsky G: **Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector.** *Stem Cells* 2009, **28**:64-74.
507. Zhang XY, La Russa VF, Reiser J: **Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins.** *J Virol* 2004, **78**:1219-1229.
508. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L: **A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.** *J Virol* 1998, **72**:8463-8471.
509. Butler SL, Hansen MS, Bushman FD: **A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo.** *Nat Med* 2001, **7**:631-634.
510. Charrier S, Ferrand M, Zerbato M, Precigout G, Viorner A, Bucher-Laurent S, Benkhelifa-Ziyyat S, Merten OW, Perea J, Galy A: **Quantification of lentiviral vector copy numbers in**

- individual hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction. *Gene Ther* 2011, **18**:479-487.
511. ter Brake O, t Hooft K, Liu YP, Centlivre M, von Eije KJ, Berkhout B: **Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition.** *Mol Ther* 2008, **16**:557-564.
 512. Chono H, Goto Y, Yamakawa S, Tanaka S, Tosaka Y, Nukaya I, Mineno J: **Optimization of lentiviral vector transduction into peripheral blood mononuclear cells in combination with the fibronectin fragment CH-296 stimulation.** *J Biochem* 2011, **149**:285-292.
 513. Chono H, Yoshioka H, Ueno M, Kato I: **Removal of inhibitory substances with recombinant fibronectin-CH-296 plates enhances the retroviral transduction efficiency of CD34(+)CD38(-) bone marrow cells.** *J Biochem* 2001, **130**:331-334.
 514. Moritz T, Dutt P, Xiao X, Carstanjen D, Vik T, Hanenberg H, Williams DA: **Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments.** *Blood* 1996, **88**:855-862.
 515. Murray L, Luens K, Tushinski R, Jin L, Burton M, Chen J, Forestell S, Hill B: **Optimization of retroviral gene transduction of mobilized primitive hematopoietic progenitors by using thrombopoietin, Flt3, and Kit ligands and RetroNectin culture.** *Hum Gene Ther* 1999, **10**:1743-1752.
 516. Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, Alt FW, Murphy GJ, Kotton DN, Mostoslavsky G: **Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector.** *Stem Cells* 2010, **28**:64-74.
 517. Chevalier S, Praloran V, Smith C, Mac Grogan D, Ip NY, Yancopoulos GD, Brachet P, Pouplard A, Gascan H: **Expression and functionality of the *trkA* proto-oncogene product/ngf receptor in undifferentiated hematopoietic cells.** *Blood* 1994, **83**:1479-1485.
 518. Huang X, Darzynkiewicz Z: **Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage.** *Methods Mol Biol* 2006, **314**:73-80.
 519. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
 520. Navarro S, Meza NW, Quintana-Bustamante O, Casado JA, Jacome A, McAllister K, Puerto S, Surrallés J, Segovia JC, Bueren JA: **Hematopoietic dysfunction in a mouse model for fanconi anemia group d1.** *Mol Ther* 2006, **14**:525-535.
 521. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG: **Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.** *Nat Genet* 2000, **24**:372-376.
 522. Oka M, Moriyama T, Asally M, Kawakami K, Yoneda Y: **Differential role for transcription factor Oct4 nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell reprogramming and self-renewal of embryonic stem cells.** *J Biol Chem* 2013, **288**:15085-15097.
 523. Adachi K, Suemori H, Yasuda SY, Nakatsuji N, Kawase E: **Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells.** *Genes Cells* 2010, **15**:455-470.
 524. Bourillot PY, Savatier P: **Kruppel-like transcription factors and control of pluripotency.** *BMC Biol* 2010, **8**:125.
 525. Wei Z, Yang Y, Zhang P, Andrianakos R, Hasegawa K, Lyu J, Chen X, Bai G, Liu C, Pera M, Lu W: **Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming.** *Stem Cells* 2009, **27**:2969-2978.
 526. Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, Vrana J, Jones K, Grotewold L, Smith A: **Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development.** *Nature* 2007, **450**:1230-1234.
 527. Araki R, Hoki Y, Uda M, Nakamura M, Jincho Y, Tamura C, Sunayama M, Ando S, Sugiura M, Yoshida MA, et al: **Crucial role of c-Myc in the generation of induced pluripotent stem cells.** *Stem Cells* 2011, **29**:1362-1370.
 528. Varlakhanova NV, Cotterman RF, deVries WN, Morgan J, Donahue LR, Murray S, Knowles BB, Knoepfler PS: **myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal.** *Differentiation* 2010, **80**:9-19.

529. Son MY, Choi H, Han YM, Cho YS: **Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency.** *Stem Cells* 2013.
530. Charrier S, Dupre L, Scaramuzza S, Jeanson-Leh L, Blundell MP, Danos O, Cattaneo F, Aiuti A, Eckenberg R, Thrasher AJ, et al: **Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients.** *Gene Ther* 2007, **14**:415-428.
531. Samper E, Fernandez P, Eguia R, Martin-Rivera L, Bernad A, Blasco MA, Aracil M: **Long-term repopulating ability of telomerase-deficient murine hematopoietic stem cells.** *Blood* 2002, **99**:2767-2775.
532. Estrada JC, Albo C, Benguria A, Dopazo A, Lopez-Romero P, Carrera-Quintanar L, Roche E, Clemente EP, Enriquez JA, Bernad A, Samper E: **Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis.** *Cell Death Differ* 2012, **19**:743-755.
533. Jacome A, Navarro S, Casado JA, Rio P, Madero L, Estella J, Sevilla J, Badell I, Ortega JJ, Olive T, et al: **A simplified approach to improve the efficiency and safety of ex vivo hematopoietic gene therapy in fanconi anemia patients.** *Hum Gene Ther* 2006, **17**:245-250.
534. Auerbach AD: **Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test.** *Exp Hematol* 1993, **21**:731-733.
535. Dybedal I, Bryder D, Fossum A, Rusten LS, Jacobsen SE: **Tumor necrosis factor (TNF)-mediated activation of the p55 TNF receptor negatively regulates maintenance of cycling reconstituting human hematopoietic stem cells.** *Blood* 2001, **98**:1782-1791.
536. Haneline LS, Broxmeyer HE, Cooper S, Hangoc G, Carreau M, Buchwald M, Clapp DW: **Multiple inhibitory cytokines induce deregulated progenitor growth and apoptosis in hematopoietic cells from Fac-/- mice.** *Blood* 1998, **91**:4092-4098.
537. Nakanishi K, Cavallo F, Perrouault L, Giovannangeli C, Moynahan ME, Barchi M, Brunet E, Jasin M: **Homology-directed Fanconi anemia pathway cross-link repair is dependent on DNA replication.** *Nat Struct Mol Biol* 2011, **18**:500-503.
538. Nakanishi K, Yang YG, Pierce AJ, Taniguchi T, Digweed M, D'Andrea AD, Wang ZQ, Jasin M: **Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:1110-1115.
539. Muller LU, Milsom MD, Harris CE, Vyas R, Brumme KM, Parmar K, Moreau LA, Schambach A, Park IH, London WB, et al: **Overcoming Reprogramming Resistance of Fanconi Anemia Cells.** *Blood* 2012.
540. Alter BP, Kupfer G: **Fanconi Anemia.** 1993.
541. Garcia-Escudero V, Garcia-Gomez A, Gargini R, Martin-Bermejo MJ, Langa E, de Yebenes JG, Delicado A, Avila J, Moreno-Flores MT, Lim F: **Prevention of senescence progression in reversibly immortalized human ensheathing glia permits their survival after deimmortalization.** *Mol Ther* 2010, **18**:394-403.
542. Yung SK, Tilgner K, Ledran MH, Habibollah S, Neganova I, Singhapol C, Saretzki GC, Stojkovic M, Armstrong L, Przyborski SA, Lako M: **Human pluripotent stem cell models of Fanconi Anaemia deficiency reveal an important role for Fanconi Anaemia proteins in cellular reprogramming and survival of haematopoietic progenitors.** *Stem Cells* 2012.
543. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A: **Human embryonic stem cells.** *J Cell Sci* 2000, **113** (Pt 1):5-10.
544. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, Bello PA, Benvenisty N, Berry LS, Bevan S, et al: **Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**:803-816.
545. Meissner A: **Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells.** *Nat Biotechnol* 2010, **28**:1079-1088.
546. Reik W, Dean W, Walter J: **Epigenetic reprogramming in mammalian development.** *Science* 2001, **293**:1089-1093.

547. Barrand S, Collas P: **Chromatin states of core pluripotency-associated genes in pluripotent, multipotent and differentiated cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **391**:762-767.
548. Barrand S, Andersen IS, Collas P: **Promoter-exon relationship of H3 lysine 9, 27, 36 and 79 methylation on pluripotency-associated genes.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **401**:611-617.
549. Christophersen NS, Helin K: **Epigenetic control of embryonic stem cell fate.** *J Exp Med* 2010, **207**:2287-2295.
550. Berdasco M, Esteller M: **DNA methylation in stem cell renewal and multipotency.** *Stem Cell Res Ther* 2011, **2**:42.
551. Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassaei K, Sui G, Cutler DJ, Liu Y, Brimble SN, et al: **Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells.** *Nat Genet* 2005, **37**:1099-1103.
552. Spits C, Mateizel I, Geens M, Mertzaniadou A, Staessen C, Vandeskelde Y, Van der Elst J, Liebaers I, Sermon K: **Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:1361-1363.
553. Taapken SM, Nisler BS, Newton MA, Sampsel-Barron TL, Leonhard KA, McIntire EM, Montgomery KD: **Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**:313-314.
554. Ruiz S, Gore A, Li Z, Panopoulos AD, Montserrat N, Fung HL, Giorgetti A, Bilic J, Batchelder EM, Zaehres H, et al: **Analysis of protein-coding mutations in hiPSCs and their possible role during somatic cell reprogramming.** *Nat Commun* 2013, **4**:1382.
555. Dekel-Naftali M, Aviram-Goldring A, Litmanovitch T, Shamash J, Reznik-Wolf H, Laevsky I, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Yung Y, Hourvitz A, et al: **Screening of human pluripotent stem cells using CGH and FISH reveals low-grade mosaic aneuploidy and a recurrent amplification of chromosome 1q.** *Eur J Hum Genet* 2012, **20**:1248-1255.
556. Lu SJ, Feng Q, Caballero S, Chen Y, Moore MA, Grant MB, Lanza R: **Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells.** *Nat Methods* 2007, **4**:501-509.
557. Feng Q, Lu SJ, Klimanskaya I, Gomes I, Kim D, Chung Y, Honig GR, Kim KS, Lanza R: **Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence.** *Stem Cells* 2010, **28**:704-712.
558. Vodyanik MA, Thomson JA, Slukvin, II: **Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures.** *Blood* 2006, **108**:2095-2105.
559. Ramos-Mejia V, Montes R, Bueno C, Ayllon V, Real PJ, Rodriguez R, Menendez P: **Residual expression of the reprogramming factors prevents differentiation of iPSC generated from human fibroblasts and cord blood CD34+ progenitors.** *PLoS One* 2012, **7**:e35824.
560. Callen E, Tischkowitz MD, Creus A, Marcos R, Bueren JA, Casado JA, Mathew CG, Surralles J: **Quantitative PCR analysis reveals a high incidence of large intragenic deletions in the FANCA gene in Spanish Fanconi anemia patients.** *Cytogenet Genome Res* 2004, **104**:341-345.
561. Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS: **High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G.** *J Virol* 1996, **70**:2581-2585.
562. Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH: **Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector.** *J Virol* 1997, **71**:6641-6649.
563. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM: **Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors.** *Nat Genet* 1997, **17**:314-317.
564. Sutton RE, Wu HT, Rigg R, Bohnlein E, Brown PO: **Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells.** *J Virol* 1998, **72**:5781-5788.
565. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE: **Retroviruses.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 1997.

566. Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, Collins F, Shinn P, Leipzig J, Hannenhalli S, et al: **Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection.** *PLoS Pathog* 2006, **2**:e60.
567. Uren AG, Kool J, Berns A, van Lohuizen M: **Retroviral insertional mutagenesis: past, present and future.** *Oncogene* 2005, **24**:7656-7672.
568. Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD: **Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences.** *PLoS Biol* 2004, **2**:E234.
569. Lieberman J, Song E, Lee SK, Shankar P: **Interfering with disease: opportunities and roadblocks to harnessing RNA interference.** *Trends Mol Med* 2003, **9**:397-403.
570. Song E, Lee SK, Dykxhoorn DM, Novina C, Zhang D, Crawford K, Cerny J, Sharp PA, Lieberman J, Manjunath N, Shankar P: **Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages.** *J Virol* 2003, **77**:7174-7181.
571. Morris KV, Rossi JJ: **Lentivirus-mediated RNA interference therapy for human immunodeficiency virus type 1 infection.** *Hum Gene Ther* 2006, **17**:479-486.
572. Wiznerowicz M, Szulc J, Trono D: **Tuning silence: conditional systems for RNA interference.** *Nat Methods* 2006, **3**:682-688.
573. Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ: **Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown.** *Methods Mol Biol* 2010, **629**:141-158.
574. Wei N, Zhang L, Huang H, Chen Y, Zheng J, Zhou X, Yi F, Du Q, Liang Z: **siRNA has greatly elevated mismatch tolerance at 3'-UTR sites.** *PLoS One* 2012, **7**:e49309.
575. Birmingham A, Anderson E, Sullivan K, Reynolds A, Boese Q, Leake D, Karpilow J, Khvorova A: **A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity.** *Nat Protoc* 2007, **2**:2068-2078.
576. Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilesley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, et al: **3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets.** *Nat Methods* 2006, **3**:199-204.
577. Zheng L, Baumann U, Reymond JL: **An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:e115.
578. Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS: **Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent edomitosis in Fanconi anemia cells.** *Am J Hum Genet* 1985, **37**:1022-1030.
579. Lecourt S, Vanneaux V, Leblanc T, Leroux G, Ternaux B, Benbunan M, Chomienne C, Baruchel A, Marolleau JP, Gluckman E, et al: **Bone marrow microenvironment in Fanconi Anemia: a prospective functional study in a cohort of Fanconi Anemia patients.** *Stem Cells Dev* 2009.
580. Aleman LM, Doench J, Sharp PA: **Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects.** *RNA* 2007, **13**:385-395.
581. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS: **Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity.** *Rna* 2006, **12**:1179-1187.
582. Shimamura A, de Oca RM, Svenson JL, Haining N, Moreau LA, Nathan DG, D'Andrea AD: **A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway.** *Blood* 2002, **100**:4649-4654.
583. Alpi AF, Patel KJ: **Monoubiquitylation in the Fanconi anemia DNA damage response pathway.** *DNA Repair (Amst)* 2009, **8**:430-435.
584. Wang X, Andreassen PR, D'Andrea AD: **Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:5850-5862.
585. Montes de Oca R, Andreassen PR, Margossian SP, Gregory RC, Taniguchi T, Wang X, Houghtaling S, Grompe M, D'Andrea AD: **Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin.** *Blood* 2005, **105**:1003-1009.

586. Pinto FO, Leblanc T, Chamousset D, Le Roux G, Brethon B, Cassinat B, Larghero J, de Villartay JP, Stoppa-Lyonnet D, Baruchel A, et al: **Diagnosis of Fanconi anemia in patients with bone marrow failure.** *Haematologica* 2009, **94**:487-495.
587. Jacquemont C, Taniguchi T: **The Fanconi anemia pathway and ubiquitin.** *BMC Biochem* 2007, **8 Suppl 1**:S10.
588. Gregory RC, Taniguchi T, D'Andrea AD: **Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination.** *Semin Cancer Biol* 2003, **13**:77-82.
589. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD: **Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway.** *Mol Cell* 2001, **7**:249-262.
590. Meetei AR, Yan Z, Wang W: **FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination.** *Cell Cycle* 2004, **3**:179-181.
591. Vandenberg CJ, Gergely F, Ong CY, Pace P, Mallery DL, Hiom K, Patel KJ: **BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2.** *Mol Cell* 2003, **12**:247-254.
592. Auerbach AD: **Fanconi anemia and its diagnosis.** *Mutat Res* 2009, **668**:4-10.
593. Litman R, Gupta R, Brosh RM, Jr., Cantor SB: **BRCA-FA pathway as a target for anti-tumor drugs.** *Anticancer Agents Med Chem* 2008, **8**:426-430.
594. Otsuki T, Wang J, Demuth I, Digweed M, Liu JM: **Assessment of mitomycin C sensitivity in Fanconi anemia complementation group C gene (Fac) knock-out mouse cells.** *Int J Hematol* 1998, **67**:243-248.
595. Cervenka J, Arthur D, Yasis C: **Mitomycin C test for diagnostic differentiation of idiopathic aplastic anemia and Fanconi anemia.** *Pediatrics* 1981, **67**:119-127.
596. Wang LC, Gautier J: **The Fanconi anemia pathway and ICL repair: implications for cancer therapy.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010, **45**:424-439.
597. Kee Y, D'Andrea AD: **Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability.** *Genes Dev* 2010, **24**:1680-1694.
598. Niedernhofer LJ, Lalai AS, Hoeijmakers JH: **Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair.** *Cell* 2005, **123**:1191-1198.
599. Leung RK, Whittaker PA: **RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics.** *Pharmacol Ther* 2005, **107**:222-239.
600. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD: **Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study.** *Blood* 1994, **84**:1650-1655.
601. Segal GM, Magenis RE, Brown M, Keeble W, Smith TD, Heinrich MC, Bagby GC, Jr.: **Repression of Fanconi anemia gene (FACC) expression inhibits growth of hematopoietic progenitor cells.** *J Clin Invest* 1994, **94**:846-852.
602. Chen CC, Taniguchi T, D'Andrea A: **The Fanconi anemia (FA) pathway confers glioma resistance to DNA alkylating agents.** *J Mol Med (Berl)* 2007, **85**:497-509.
603. Kondo N, Takahashi A, Mori E, Noda T, Zdzienicka MZ, Thompson LH, Helleday T, Suzuki M, Kinashi Y, Masunaga S, et al: **FANCD1/BRCA2 plays predominant role in the repair of DNA damage induced by ACNU or TMZ.** *PLoS One* 2011, **6**:e19659.
604. Sasaki MS, Tonomura A: **A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents.** *Cancer Res* 1973, **33**:1829-1836.
605. Stark R, Thierry D, Richard P, Gluckman E: **Long-term bone marrow culture in Fanconi's anaemia.** *Br J Haematol* 1993, **83**:554-559.
606. Ridet A, Guillouf C, Duchaud E, Cundari E, Fiore M, Moustacchi E, Rosselli F: **Deregulated apoptosis is a hallmark of the Fanconi anemia syndrome.** *Cancer Res* 1997, **57**:1722-1730.
607. Migliarina R, Le Coniat M, Berger R: **A simple diagnostic test for Fanconi anemia by flow cytometry.** *Anal Cell Pathol* 1991, **3**:111-118.
608. Ceccaldi R, Parmar K, Mouly E, Delord M, Kim JM, Regairaz M, Pla M, Vasquez N, Zhang QS, Pondarre C, et al: **Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated**

- p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells.** *Cell Stem Cell* 2012, **11**:36-49.
609. Bogliolo M, Lyakhovich A, Callen E, Castella M, Cappelli E, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Kalb R, Neveling K, et al: **Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability.** *Embo J* 2007, **26**:1340-1351.
 610. Willers H, Kachnic LA, Luo CM, Li L, Purschke M, Borgmann K, Held KD, Powell SN: **Biomarkers and mechanisms of FANCD2 function.** *J Biomed Biotechnol* 2008, **2008**:821529.
 611. Haneline LS, Broxmeyer HE, Cooper S, Hangoc G, Carreau M, Buchwald M, Clapp DW: **Multiple inhibitory cytokines induce deregulated progenitor growth and apoptosis in hematopoietic cells from Fac-/- mice.** *Blood* 1998, **91**:4092-4098.
 612. Vinciguerra P, Godinho SA, Parmar K, Pellman D, D'Andrea AD: **Cytokinesis failure occurs in Fanconi anemia pathway-deficient murine and human bone marrow hematopoietic cells.** *J Clin Invest* 2010, **120**:3834-3842.
 613. Lyakhovich A, Surrallés J: **Constitutive activation of caspase-3 and Poly ADP ribose polymerase cleavage in fanconi anemia cells.** *Mol Cancer Res* 2010, **8**:46-56.
 614. Parmar K, D'Andrea A, Niedernhofer LJ: **Mouse models of Fanconi anemia.** *Mutat Res* 2009, **668**:133-140.
 615. Bakker ST, de Winter JP, te Riele H: **Learning from a paradox: recent insights into Fanconi anaemia through studying mouse models.** *Dis Model Mech* 2013, **6**:40-47.
 616. Cohen-Haguenauer O, Peault B, Bauche C, Daniel MT, Casal I, Levy V, Dausset J, Boiron M, Auclair C, Gluckman E, Marty M: **In vivo repopulation ability of genetically corrected bone marrow cells from Fanconi anemia patients.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:2340-2345.
 617. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, et al: **Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy.** *Nat Med* 1996, **2**:1329-1337.
 618. Jacome A, Navarro S, Rio P, Yanez RM, Gonzalez-Murillo A, Luz Lozano M, Lamana ML, Sevilla J, Olive T, Díaz-Heredia C, et al: **Lentiviral-mediated Genetic Correction of Hematopoietic and Mesenchymal Progenitor Cells From Fanconi Anemia Patients.** *Mol Ther* 2009.
 619. Castella M, Pujol R, Callen E, Trujillo JP, Casado JA, Gille H, Lach FP, Auerbach AD, Schindler D, Benitez J, et al: **Origin, functional role and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations.** *Blood* 2011.
 620. Joung JK, Sander JD: **TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013, **14**:49-55.
 621. Verma IM, Somia N: **Gene therapy -- promises, problems and prospects.** *Nature* 1997, **389**:239-242.
 622. Xia F, Taghian DG, DeFrank JS, Zeng ZC, Willers H, Iliakis G, Powell SN: **Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:8644-8649.
 623. Abaji C, Cousineau I, Belmaaza A: **BRCA2 regulates homologous recombination in response to DNA damage: implications for genome stability and carcinogenesis.** *Cancer Res* 2005, **65**:4117-4125.
 624. Gregory JJ, Jr., Wagner JE, Verlander PC, Levran O, Batish SD, Eide CR, Steffenhagen A, Hirsch B, Auerbach AD: **Somatic mosaicism in Fanconi anemia: Evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:2532-2537.
 625. Rio P, Meza NW, Gonzalez-Murillo A, Navarro S, Alvarez L, Surrallés J, Castella M, Guenechea G, Segovia JC, Hanenberg H, Bueren JA: **In vivo proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1.** *Blood* 2008, **112**:4853-4861.
 626. Zhang X, Sejas DP, Qiu Y, Williams DA, Pang Q: **Inflammatory ROS promote and cooperate with the Fanconi anemia mutation for hematopoietic senescence.** *J Cell Sci* 2007, **120**:1572-1583.

627. Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC: **Progressive telomere shortening in aplastic anemia.** *Blood* 1998, **91**:3582-3592.
628. Hojo ET, van Diemen PC, Darroudi F, Natarajan AT: **Spontaneous chromosomal aberrations in Fanconi anaemia, ataxia telangiectasia fibroblast and Bloom's syndrome lymphoblastoid cell lines as detected by conventional cytogenetic analysis and fluorescence in situ hybridisation (FISH) technique.** *Mutat Res* 1995, **334**:59-69.
629. Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM, Borkent M, Apostolou E, Alaei S, Cloutier J, et al: **A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells.** *Cell* 2012, **151**:1617-1632.
630. Sommer CA, Christodoulou C, Gianotti-Sommer A, Shen SS, Sailaja BS, Hezroni H, Spira A, Meshorer E, Kotton DN, Mostoslavsky G: **Residual expression of reprogramming factors affects the transcriptional program and epigenetic signatures of induced pluripotent stem cells.** *PLoS One* 2012, **7**:e51711.
631. Hotta A, Ellis J: **Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states.** *J Cell Biochem* 2008, **105**:940-948.
632. Lensch MW, Schlaeger TM, Zon LI, Daley GQ: **Teratoma formation assays with human embryonic stem cells: a rationale for one type of human-animal chimera.** *Cell Stem Cell* 2007, **1**:253-258.
633. Lensch MW, Ince TA: **The terminology of teratocarcinomas and teratomas.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**:1211; author reply 1211-1212.
634. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T: **Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells.** *Curr Biol* 2001, **11**:1553-1558.
635. Blasco MA, Serrano M, Fernandez-Capetillo O: **Genomic instability in iPS: time for a break.** *Embo J* 2011, **30**:991-993.
636. Martins-Taylor K, Nisler BS, Taapken SM, Compton T, Crandall L, Montgomery KD, Lalande M, Xu RH: **Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**:488-491.
637. Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Narva E, Ng S, Sourour M, Hamalainen R, Olsson C, et al: **Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency.** *Nature* 2011, **471**:58-62.
638. Pasi CE, Dereli-Oz A, Negrini S, Friedli M, Fragola G, Lombardo A, Van Houwe G, Naldini L, Casola S, Testa G, et al: **Genomic instability in induced stem cells.** *Cell Death Differ* 2011, **18**:745-753.
639. Liu W, Li M, Qu J, Yi F, Liu GH: **Reevaluation of the safety of induced pluripotent stem cells: a call from somatic mosaicism.** *Protein Cell* 2012.

ANEXO

blood

2012 119: 3042-3049
Prepublished online February 6, 2012;
doi:10.1182/blood-2011-01-331017

Down-regulated expression of *hsa-miR-181c* in Fanconi anemia patients: implications in TNF α regulation and proliferation of hematopoietic progenitor cells

Paula Río, Xabier Agirre, Leire Garate, Rocío Baños, Lara Álvarez, Edurne San José-Enériz, Isabel Badell, José A. Casado, Marina Garín, Felipe Prósper and Juan A. Bueren

Updated information and services can be found at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/119/13/3042.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
[Hematopoiesis and Stem Cells](#) (3196 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>



Down-regulated expression of *hsa-miR-181c* in Fanconi anemia patients: implications in TNF α regulation and proliferation of hematopoietic progenitor cells

Paula Río,¹ Xabier Agirre,² Leire Garate,² Rocío Baños,¹ Lara Álvarez,¹ Edurne San José-Enériz,² Isabel Badell,³ José A. Casado,¹ Marina Garín,¹ Felipe Prósper,² and Juan A. Bueren¹

¹Hematopoiesis and Gene Therapy Division, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Madrid, Spain; ²Hematology Department, Clínica Universidad de Navarra y Fundación para la Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra. Pamplona, Spain; and ³Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Fanconi anemia (FA) is an inherited genetic disorder associated with BM failure and cancer predisposition. In the present study, we sought to elucidate the role of microRNAs (miRNAs) in the hematopoietic defects observed in FA patients. Initial studies showed that 3 miRNAs, *hsa-miR-133a*, *hsa-miR-135b*, and *hsa-miR-181c*, were significantly down-regulated in lymphoblastoid cell lines and fresh peripheral blood cells from FA patients. In vitro studies with cells expressing the

luciferase reporter fused to the TNF α 3'-untranslated region confirmed in silico predictions suggesting an interaction between *hsa-miR-181c* and TNF α mRNA. These observations were consistent with the down-regulated expression of TNF α mediated by *hsa-miR-181c* in cells from healthy donors and cells from FA patients. Because of the relevance of TNF α in the hematopoietic defects of FA patients, in the present study, we transduced BM cells from FA patients with

***hsa-miR-181c* to evaluate the impact of this miRNA on their clonogenic potential. *hsa-miR-181c* markedly increased the number and size of the myeloid and erythroid colonies generated by BM cells from FA patients. Our results offer new clues toward understanding the biologic basis of BM failure in FA patients and open new possibilities for the treatment of the hematologic dysfunction in FA patients based on miRNA regulation. (*Blood*. 2012;119(13):3042-3049)**

Introduction

microRNAs (miRNAs) are 20- to 24-nucleotide RNAs that regulate gene expression mainly by destabilizing target mRNAs through partial base pairing complementary sites.¹ Since their original description, multiple miRNAs have been shown to regulate the development and differentiation of different tissues,² including the hematopoietic system.³⁻⁵ In addition, miRNAs have been shown to act as tumor suppressors⁶ or oncogenes in the development of hematologic malignancies.⁷⁻⁹

Because Fanconi anemia (FA) is a complex disease mainly associated with BM failure and cancer predisposition,¹⁰ we investigated whether specific miRNAs are deregulated and play a role in the hematopoietic dysfunction of FA patients. Among the hematologic dysfunctions of FA patients, macrocytosis is often the first detected, followed by thrombocytopenia and neutropenia. A high incidence of cancers, principally acute myeloid leukemia and squamous cell carcinoma, is also associated with FA.¹¹ Data from the International Fanconi Anemia Registry showed that in these patients, the actuarial risk of developing BM failure and hematologic and nonhematologic malignancies by 40 years of age is 90%, 33%, and 28%, respectively.¹⁰ Differences in the clinical symptoms of FA patients are difficult to interpret. Nevertheless, because FA is a chromosomal instability disorder, FA cells accumulate DNA damage at an increased rate. Unrepaired DNA damage may activate apoptotic pathways, thus potentially leading to BM failure, or may

induce additional mutations and translocations that may finally result in solid tumors or leukemias.¹²

Although the exact function of FA proteins is not clearly understood, 8 FA proteins (FANCA, FANCB, FANCC, FANCG, FANCF, FANCE, FANCL, and FANCM) interact to form an FA core complex that is responsible for the mono-ubiquitination of FANCD2 and FANCI, known as the ID complex.^{13,14} After mono-ubiquitination, both proteins migrate to sites of DNA damage, forming DNA repair foci in association with other proteins, including FANCI/BRIP1, FANCD1/BRCA2, and FANCN/PALB2.¹⁵ An additional molecule, the nuclease FAN1, was shown recently to be an essential partner in the FA pathway because of its interaction with the ID complex and its further recruitment to sites of DNA damage.¹⁶⁻¹⁹ Finally, the observation that FANCP (SLX4)^{20,21} has endonuclease activity is allowing investigators to unravel the role of the FA/BRCA pathway in the repair of DNA interstrand cross-links during replication.²²

In the present study, miRNA expression analyses in lymphoblastic cell lines (LCLs) and peripheral blood (PB) cells from FA patients and healthy donors (HDs) showed that 3 different miRNAs were specifically down-regulated in FA hematopoietic cells. In silico studies and in vitro experiments of gene interference showed that one of the miRNAs that is consistently down-regulated in FA samples is *hsa-miR-181c*. Moreover, our results demonstrate that

Submitted January 18, 2011; accepted January 16, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, February 6, 2012; DOI 10.1182/blood-2011-01-331017.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

this miRNA interacts with TNF α , playing an important role in the functional properties of FA hematopoietic progenitors.

Methods

Cell lines and primary cells

FA patients were diagnosed based on clinical symptoms and chromosome breakage tests of PB cells using DNA cross-linker drugs.²³ Patients and HDs were encoded to protect their confidentiality, and informed consent was obtained in all cases according to institutional regulations. EBV-transformed LCLs from FA patients were grown in RPMI medium (GIBCO) supplemented with 15% FBS, glutamine, and antibiotics (0.5% penicillin and streptomycin).

PB mononuclear cells (MNCs) were obtained by Ficoll fractionation. BM samples were depleted from erythrocytes with hydroxyethyl starch as described previously²⁴ and cultured in IMDM supplemented with 20% FBS and antibiotics (0.5% penicillin and streptomycin) in the presence of thrombopoietin (50 ng/mL; R&D Systems), SCF (150 ng/mL; Peprotech), and Flt3 ligand (50 ng/mL; Invitrogen).

The RKO cell line (a colon carcinoma cell line) was grown in DMEM supplemented with 10% FBS, glutamine, and antibiotics (0.5% penicillin and streptomycin).

RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR quantification of miRNAs

2.5–10⁶ cells from either LCLs or PB from healthy and FA-A patients was used for RNA extraction using the TRIzol total RNA isolation reagent (Molecular Probes). cDNA was synthesized using gene-specific primers designed by Applied Biosystems (<http://www5.appliedbiosystems.com/tools/mirna/>) according to the TaqMan miRNA assay protocol (PE Applied Biosystems). The reaction was prepared as described previously.²⁵ Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using an Applied Biosystems 7300 Sequence Detection system and a Rotor Gene using 1.33 μ L of RT product, 1 \times TaqMan Universal PCR master mix, and 1 μ L of primers and probe mix of the TaqMan miRNA assay protocol (PE Applied Biosystems). The reaction was incubated at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 10 minutes. The Ct data were calculated using default threshold settings. Normalization of the data was done using the *RNU6B* gene as an endogenous control. Relative quantification of expression of analyzed miRNAs was calculated with the 2^{− $\Delta\Delta$ Ct} method (Applied Biosystems user bulletin number 2, P/N 4303859). Data are presented as log 2^{− $\Delta\Delta$ Ct} of the relative quantity of miRNAs, normalized and compared with the mean relative expression value of control cell lines or PB samples. A supervised analysis using the significant analysis of microarrays algorithm was performed to identify miRNAs with statistically significant changes in expression between groups.

DNA methylation analysis

DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). Methylation-specific PCR (MSP) was used to analyze the methylation status of the CpG sites located 5' upstream of *hsa-miR-181c* and was performed as described previously. For the *hsa-miR-181c*-MSP, the following primers were used: *hsa-miR-181c*-MD (5'-GTTCGTAGATTAGGT-TAGGGGC-3') and *hsa-miR-181c*-MR (5'-CAATAATCGCACAAAATTC-GAC-3'), which amplify a 151-bp product, for the methylated reaction and primers *hsa-miR-181c*-UD (5'-GTTTGTAGATTAGGT-TAGGGGTGA-3') and *hsa-miR-181c*-UR (5'-CTCCAATAATCACAAAATTC AAC-3'), which amplify a 154 bp product, for the unmethylated reaction. PCR conditions for the *hsa-miR-181c*-MD/*hsa-miR-181c*-MR primers were 94°C for 10 minutes, followed by 35 cycles at 94°C for 1 minute, 60°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute. PCR conditions for the *hsa-miR-181c*-UD/*hsa-miR-181c*-UR primers were 94°C for 10 minutes, followed by 35 cycles at 94°C for 1 minute, 58°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute. The final extension was at 72°C for 10 minutes. The products were separated by electrophoresis on a 1.8% agarose gel.

The 4 CpG dinucleotides that are located in the genomic sequence that results in mature miRNA *hsa-miR-181c* were analyzed by pyrosequencing, as described previously.²⁶ After bisulfite treatment of DNA, "hot-start" PCR was performed using *hsa-miR-181c*-PD (5'-TTTATGAGAGAAAA-GGGGTTTTTTAT-3') and *hsa-miR-181c*-PR (biotin-5'-AAAAATAA-CAATCCAAACCTCAAA-3'). PCR conditions were 94°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 94°C for 1 minute, 58°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute. The final extension was at 72°C for 10 minutes. The resulting biotinylated PCR products were immobilized to streptavidin Sepharose High Performance beads (GE Healthcare) and processed to yield high-quality ssDNA using the PyroMark Vacuum Prep Workstation (Biotage) according to the manufacturer's instructions. The pyrosequencing reactions were performed using Pyromark ID (Biotage) and sequence analysis was performed using the *hsa-miR-181c*-SEQ1 (5'-ATGTTTTTTGGTTTTTT-GTTATTTATTTTA-3') and *hsa-miR-181c*-SEQ2 (5'-TTTGTTAAGG-GTTTGGGGGAATATTTAATTG-3') primers and PyroQ-CpG Version 1.0.9 analysis software (Biotage).

Human male genomic DNA universally methylated for all genes (Intergen) was used as a positive control for methylated alleles (not shown). Water blanks were included with each assay. The results were always confirmed by repeating the MSP assays or by pyrosequencing after an independently performed bisulfite treatment.

Cell transfection and transduction with miRNAs

Lymphoblast cell lines and primary BM samples from FA-A patients were transfected either with a negative-precursor miRNA control (Pre-miR Control #1; Applied Biosystems) or a Pre-miR-181c precursor molecule using siNeoFX reagent (Ambion). Briefly, retronectin-coated plates were used to transfect 2.5 \times 10⁵ LCLs or BM cells with Pre-miR molecules. Transfection was repeated after 24 hours and 48 hours later, cells were harvested for functional and expression assays. To determine the transfection efficiency in these experiments, a carboxyfluorescein dye-labeled Pre-miR negative control (Applied Biosystems) was used. The transfection efficiency was determined as the percentage of FITC-positive cells as measured by flow cytometry 2 days after transfection. Cell viabilities were determined by analyzing the proportion of propidium iodide-negative cells by flow cytometry (EPICS XL; Coulter Electronics).

To stably transduce BM cells from FA patients, infective supernatants containing lentiviral vectors carrying the Pre-miR-181c and enhanced green fluorescent protein (EGFP) genes (Pre-miR-181c-EGFP LV; System Biosciences) or a control vector (EGFP LV) were generated as described previously.²⁷ Briefly, 5 \times 10⁵ FA-BM cells were cultured in IMDM supplemented with 20% FBS and 300 ng/mL of human SCF (Peprotech), 100 ng/mL of human thrombopoietin (R&D Systems), and 100 ng/mL of Flt3 ligand (Invitrogen) in retronectin-coated wells (Takara Shuzo). Two rounds of infection were conducted with either LV:Pre-miR-181c EGFP or LV:EGFP and the efficiency of transduction was analyzed by the percentage of EGFP-positive cells measured by flow cytometry in a FACS LSR-Fortessa flow cytometer (BD Biosciences).

mRNA expression analyses of target genes

BM samples transfected with Pre-miR control or Pre-miR-181c were harvested 48 hours after transfection and RNA was extracted with TRIzol reagent, as described previously. Total RNA was obtained and the expression of *TNF α* , *IL-1 β* , *RAD54B*, and β -*ACTIN* was studied with SYBR Green Supermix (Applied Biosystems) using the following primers: *TNF α* -F: 5'-CAGCCTCTTCTCCTTCTGAT-3' and *TNF α* -R: 5'-GCCAGA GGGCTGATTAGAGA-3'; *IL-1 β* -F: 5'-CTGCTCGCGTGT-GAAAGA-3' and *IL-1 β* -R: 5'-TTGGGTAAT TTTTGGGATCTACA-3'; *RAD54B*-F: 5'-TCATGATCTGCTTGACTGTGAG-3' and *RAD54B*-R: 5'-TTTTTCCAACGAATCACCTGT-3'; and hDNA-RNA- β -*ACTIN*-F: 5'-ATTGGCAATGAGCGGTTCC-3' and hRNA- β -*ACTIN*-R: 5'-CACAGG ACTCCATGCCCA-3'.

TNF α analyses

Intracellular levels of TNF α in erythrocyte-depleted BM cells previously transduced or transfected with miRNA constructs were determined by flow

cytometry 48 hours after miRNA transfection. Samples were incubated for 5 hours with 50 ng/mL of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich), lipopolysaccharide (LPS; 1 µg/mL; Sigma-Aldrich), or resiquimod (R848; 1 µg/mL; Alexis Biochemicals), together with 5 µg/mL of brefeldin A (Sigma-Aldrich), which inhibits the intracellular transport of cytokines into the Golgi complex, avoiding the extracellular release of the cytokines.²⁸ Cells were washed in PBA (PBS + 0.1% BSA) and incubated for 30 minutes at 4°C with anti-CD45-FITC or anti-CD45-PC5 (Beckman Coulter). Stained cells were resuspended for 20 minutes at 4°C in Cytotfix/Cytoperm fixation/permeabilization solution (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. After permeabilization, cells were washed twice with washing buffer and stained for intracellular TNFα using an anti-TNFα-PE Ab (BD Biosciences). Flow cytometric analysis was conducted in a FACS LSRFortessa (BD Biosciences).

Luciferase reporter assays

For reporter assays, a region of wild-type 3'-untranslated region (3'UTR) from *TNFα*, the 3'UTR from mutated *TNFα*, 3'UTR from *IL1β*, and the target *hsa-miR-181c* (which is perfectly complementary to *hsa-miR-181c* sequence) were constructed annealing the following primers: 3'UTR-TNF-α.F: 5'-CTAGTATTATTATTATTACAGATGAATGTATTATTG GGAGACCGGGGTA-3' and 3'UTR-TNF-α.R: 5'-AGCTTACCCCGTCTCCCAAATAATACATTCATCTGTAAATAAATAAATA-3'; 3'UTR-TNF-α mutated.F: 5'-TCGAGATTATTATTATTACAGATCTGCGTATTATTG GAGACCGGGTGC-3' and 3'UTR-TNF-α mutated.R: 5'-GGCCGCACCCCGGTCTCCCAAATAAATACGCAGATCTGTAAATAAATAAATAATC-3'; 3'UTR-IL1-β.F: 5'-TCGAGGTACCCAGAGAGTCCTGTGCTGAATGTGGACTCAATCCCTAGGGCTG GGC-3' and 3'UTR-IL1-β.R: 5'-GGCCGCCAGCCCTAGGGATTGAGTCCACATTCAGCACAGGACTCTCTGGGTACC-3'; and 3'UTR-Target miRNA181c.F: 5'-TCGAGATTATTACTACCGACAGGTTGAATGTTTATTG GAGACCGGGTGC-3' and 3'UTR-Target miRNA181c.R: 5'-GGCCGCACCCCGGTCTCCCAAATAAATCAACCTG TCGG TGAGTAATAATC-3'.

Annealing was conducted by incubating both primers for 4 minutes at 95°C and for 10 minutes at 70°C in annealing buffer (100mM potassium acetate, 30mM HEPES, pH 7.4, and 2mM magnesium acetate). Primers were then phosphorylated and cloned into the siCHECK2 vector from Promega digested with *XhoI* and *NotI*.

Fifty-thousand RKO cells were plated in DMEM containing 10% FBS. Twenty-four hours later, cells were transfected with the siCHECK vectors either with the Pre-miR control or the Pre-miR-181c using lipofectamine (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. For inhibition experiments, an anti-miR control or an anti-miR-181c were transfected. For LCLs, nucleofection was conducted using the cell line optimization 96-well nucleofector kit from Amaxa according to the manufacturer's recommendations. Nucleofection was done by combining siCHECK-TNFα or siCHECK-mutTNFα with Pre-miR-181c. The luciferase reporter assay was performed 24-72 hours after transfection using the Dual-Glo luciferase kit (Promega).

The ratio between the firefly and the *Renilla* luciferase allows the normalization of luciferase values. Ratios were normalized against the control plasmid. RKO experiments with miRNA transfection were performed 5 times in duplicate, and anti-miR experiments were performed 3 times, also in duplicate. Three independent experiments were conducted in LCLs. In all cases, the expression of endogenous miRNA after transfection was analyzed by RT-qPCR. Statistical differences were determined using the Student *t* test.

In vitro culture of hematopoietic progenitors

For the assessment of colony forming cells, samples consisting of at least 150 000 mononuclear or erythrocyte-depleted BM cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ and 95% humidity in Methocult H4434 medium containing SCF, GM-CSF, IL-3, and erythropoietin as growth factors (StemCell Technologies) according to standardized procedures.²⁹ Colonies were scored after 2 weeks in culture in an inverted microscope (Olympus IX70 WH10x/22) with a 4× objective.

Statistical analysis

Results are shown as the means ± SEM. Differences between groups were assessed using the 2-tailed Student *t* test. Statistical analysis of the data was performed using Prism Version 4.0 software (GraphPad).

Results

Down-regulated expression of specific miRNAs in LCLs and primary blood cells from FA-A patients

To study the involvement of miRNAs in FA, we initially determined the expression levels of 157 miRNAs in LCLs obtained from 6 HDs and 8 FA-A patients using the TaqMan miRNA assay kit. After normalizing the data using *RNU6B* as a control, we determined the mean expression level of each miRNA in the different FA cell lines and compared them with the mean values determined in control LCLs. These analyses showed a down-regulated expression of 8 miRNAs in FA LCLs: *hsa-miR-99a*, *hsa-miR-133a*, *hsa-miR-135b*, *hsa-miR-139*, *hsa-miR-181c*, *hsa-miR-182*, *hsa-miR-183*, and *hsa-miR-199s* (all of them *P* < .01 and significant analysis of microarrays score > 0.9; data not shown).

Fresh PB MNCs from 9 FA-A patients and 6 HDs were used to confirm data obtained in LCLs. In these experiments, the expression levels of 7 of the 8 miRNAs that were down-regulated in FA-LCLs were analyzed (*hsa-miR-199s* miRNA was not analyzed because it has been eliminated from the miRNA annotation list). As shown in Figure 1, no evident changes of expression were noted in 4 of 7 miRNAs, whereas a consistent down-regulated expression of 3 miRNAs, *hsa-miR-133a*, *hsa-miR-135b*, and *hsa-miR-181c*, was observed in fresh FA PB cells.

Because a reduced expression of *hsa-miR-181c* had been associated with the methylation of CpG sites located upstream of this miRNA in gastric carcinomas,³⁰ we conducted these analyses in LCLs from 2 HDs and 2 FA-A patients, and down-regulated expression of *hsa-miR-181c* was confirmed. However, MSP analyses revealed that the CpG sites upstream of the *hsa-miR-181c* were strongly methylated in LCLs not only from FA patients but also from HDs (supplemental Figure 1A, available on the Blood Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Pyrosequencing of the 4 CpG dinucleotides located in the genomic sequence that results in mature miRNA *hsa-miR-181c* showed a similar methylation of the 4 CpG dinucleotides in all samples (supplemental Figure 1B).

hsa-miR-181c regulates the expression of TNFα by interacting with its 3'UTR region

To identify potential targets of the miRNAs that were down-regulated in FA samples, in silico analyses were performed with MIRANDA software (2008 and 2010). These analyses showed that *hsa-miR-181c* had 3 potential target genes, *TNFα*, *IL-1β*, and *RAD54B*, that could be relevant in the disease. Strikingly, 2 of these genes, *TNFα* and *IL-1β*, have been reported to be overexpressed in FA cells.^{28,31,32}

To test the effect of *hsa-miR-181c* on mRNA expression of *TNFα*, *IL-1β*, and *RAD54B*, LCLs from different FA-A patients were transfected with a control pre-miRNA and Pre-miR-181c. As shown in Figure 2, the ectopic expression of Pre-miR-181c in FA-A LCLs significantly decreased the expression of *TNFα*, whereas no change in the mRNA expression of *IL-1β* and *RAD54B* was observed. Because several studies have shown TNFα overexpression in FA-C cells, the relevance of *hsa-miR-181c* in the down-regulation of TNFα was also confirmed in FA-C LCLs (supplemental Figure 2). Because miRNAs can also interfere the expression of

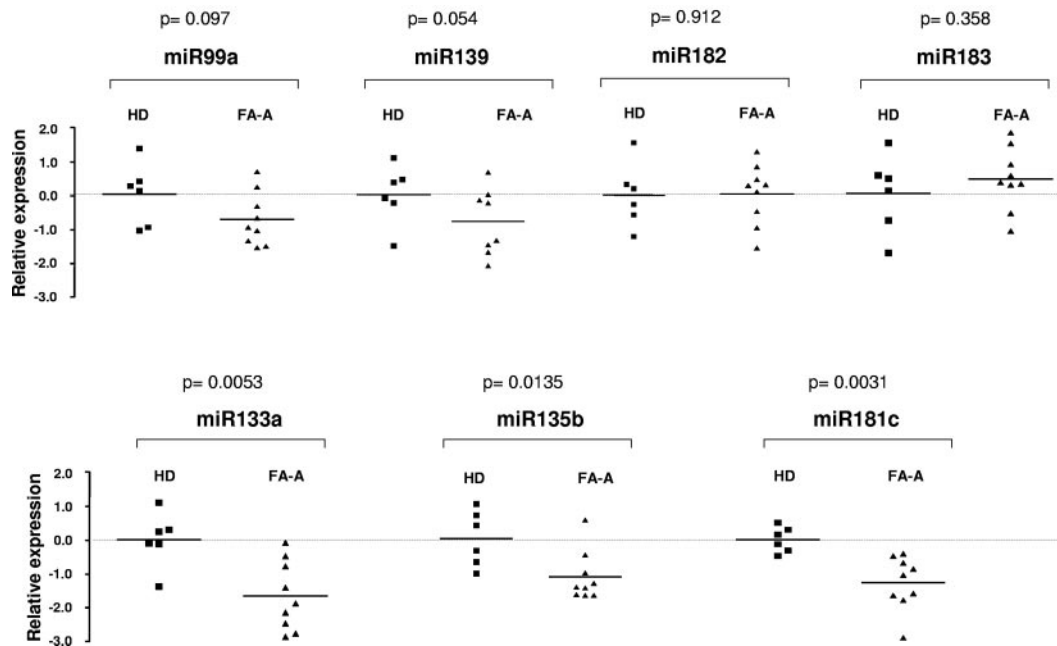


Figure 1. Comparative analysis of miRNA expression levels in primary blood cells from FA-A patients and HDs. The figure shows the relative expression of *hsa-miR-99a*, *hsa-miR-133a*, *hsa-miR-135b*, *hsa-miR-139*, *hsa-miR-181c*, *hsa-miR-182*, and *hsa-miR-183* determined by qPCR in fresh MNCs obtained from HDs (■) and FA-A patients (▲). Top panels show miRNAs in which expression was not modified in samples from FA patients compared with those from HDs. Bottom panels show miRNAs significantly down-regulated in FA-A patients. Expression levels were related to the expression of the *RNU6B* gene and normalized to mean values corresponding to HD samples.

their target genes by translational repression, our studies of RNA expression do not exclude the possibility that miR-181c may also reduce the *IL-1β* and/or *RAD54B* protein levels.

To investigate whether *hsa-miR-181c* interacts with the *TNFα* mRNA, we cloned the 3'UTR region that is hypothetically recognized by the miRNA in a luciferase reporter vector (siCHECK2-*TNFα*). In addition, a similar vector carrying the 3'UTR from the *IL-1β* was generated (siCHECK2-*IL1β*). As a negative control, a vector carrying a mutated 3'UTR of *TNFα* was constructed (siCHECK2-mut*TNFα*). As a positive control, a vector with the sequence that exactly resembles the region recognized by the *hsa-miR-181c* (siCHECK2-TargetmiR181c) was also generated.

In preliminary experiments, we confirmed that the endogenous expression of *hsa-miR-181c* in RKO cells was similar to that

observed in LCLs from HDs (data not shown). To investigate whether the endogenous expression of *hsa-miR-181c* in RKO cells could be sufficient to inhibit the expression of the *Renilla* luciferase fused to *TNFα* 3'UTR, the luciferase activity was first determined in RKO cells transfected with siCHECK2-*TNFα* and also with the negative and positive controls (siCHECK2-mut*TNFα* and siCHECK2-TargetmiR181c, respectively). As shown in Figure 3A, a significant decrease in the *Renilla* luciferase activity (normalized to firefly luciferase) was observed in RKO cells transfected with the positive control (siCHECK2-TargetmiR181c) and with the siCHECK2-*TNFα* compared with cells transfected with the negative control (siCHECK2-*TNFα* mutated).

Because other miRNAs apart from *hsa-miR-181c* that are potentially expressed in RKO cells could account for the down-regulated *Renilla* luciferase activity observed in siCHECK2-*TNFα*-transfected cells, in the next set of experiments, RKO cells were co-transfected with different siCHECK2 vectors: siCHECK-*TNFα*, siCHECK-*IL1β*, or siCHECK-mut*TNFα* and also with a Pre-miR control (Figure 3B white bars) or with the Pre-miR-181c (Figure 3B black bars). Three days after co-transfection, the relative *Renilla* luciferase activity was determined. When cells were transfected with siCHECK-*TNFα*, a significant decrease of *Renilla* luciferase activity was induced by the co-transfection with Pre-miR-181c compared with the Pre-miR control (Figure 3B first 2 bars). In samples transfected with siCHECK-*IL1β*, no significant inhibition was observed between groups co-transfected with Pre-miR-181c and the control Pre-miR (Figure 3B), which agrees well with the data shown in Figure 2. As expected, when siCHECK-mut*TNFα* was used, no inhibition was induced by Pre-miR-181c compared with the control Pre-miR (Figure 3B).

To verify the interaction of miR-181c with the *TNFα* 3'UTR region in hematopoietic cells, experiments similar to those shown in RKO cells (Figure 3B) were conducted with LCLs co-transfected with Pre-miR-181c together with siCHECK-*TNFα* or siCHECK-mut*TNFα*. As was observed in RKO cells, LCLs

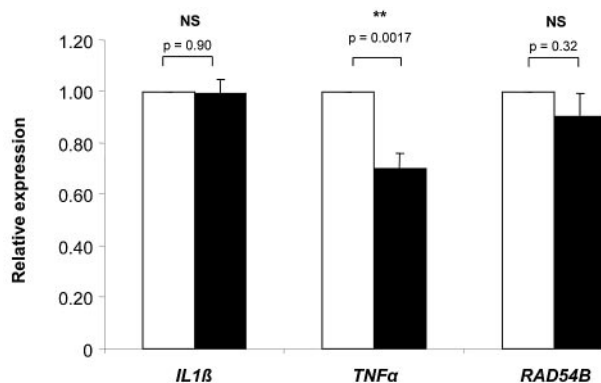


Figure 2. Relative expression of *IL-1β*, *TNFα*, and *RAD54B* in LCLs from FA-A patients transfected with a Pre-miR control and Pre-miR-181c. In all cases, mRNA expression levels were analyzed by qPCR 2 days after transfection with a Pre-miR control (white bars) or Pre-miR-181c (black bars). Expression levels were related to the expression of the human β -actin gene and normalized to mean values corresponding to LCLs transfected with the Pre-miR control. Bars corresponding to *IL-1β* and *TNFα* expression represent mean values \pm SEM of data deduced from the analysis of 3 FA patients. In the case of *RAD54B*, data from 2 patients are shown. For each determination, 3 independent experiments were conducted.

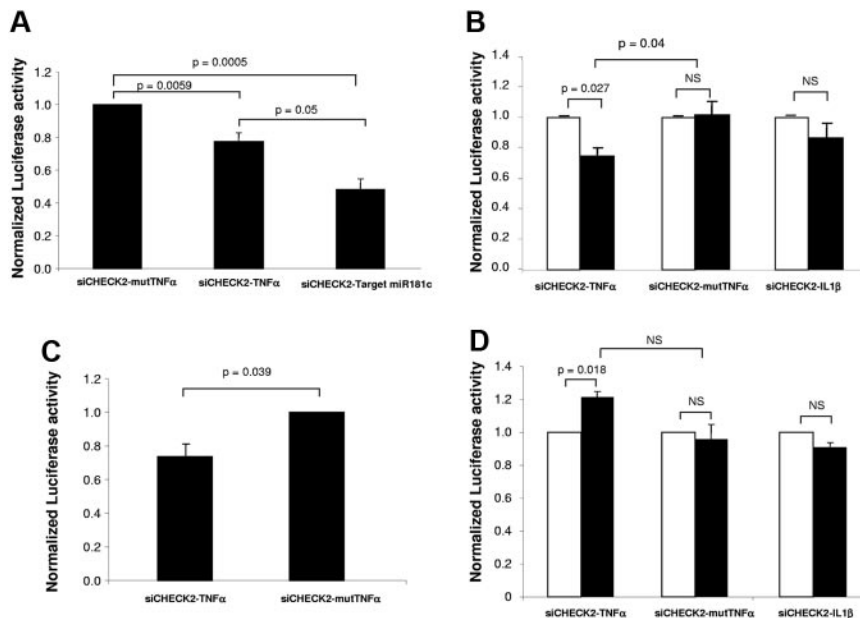


Figure 3. Pre-miR-181c regulates the expression of TNF- α by interacting with its 3' UTR sequence. Shown is the normalized *Renilla* luciferase activity in RKO cells transfected with the different constructs. (A) RKO cells were transfected with the different siCHECK2 plasmids. (B) RKO cells were co-transfected with Pre-miR control (white bars) or Pre-miR-181c (black bars) together with the different siCHECK2 plasmids. (C) LCLs from HDs were transfected with siCHECK2-mutTNF α or siCHECK2-TNF α and Pre-miR-181c. (D) RKO cells were co-transfected with anti-miR control (white bars) or with an anti-miR-181c (black bars) together with the different siCHECK2 plasmids. In all cases, *Renilla* luciferase activity was normalized to firefly luciferase activity. Bars show mean values \pm SE corresponding to 3-5 independent experiments.

transfected with the siCHECK-TNF α showed a reduced luciferase activity compared with cells transfected with siCHECK-mutTNF α (Figure 3C). These results demonstrate that *hsa-miR-181c* down-regulates the expression of TNF α by the interaction with its 3'UTR.

Finally, to confirm that the TNF α 3'UTR region is a target of *hsa-miR-181c*, in the next set of experiments, RKO cells were co-transfected with siCHECK-TNF α , siCHECK2-IL1 β , or siCHECK-mutTNF α , and also with an anti-miR control (Figure 3D white bars) or with an *hsa-miR-181c* anti-miR (Figure 3D black bars). Cells transfected with the siCHECK-TNF α vector showed an increased expression of *Renilla* luciferase activity after co-transfection with the *hsa-miR-181c* anti-miR compared with the control anti-miR (Figure 3D). Consistent with the data shown in Figure 2, no changes in expression were observed when the siCHECK-IL1 β - or the siCHECK-TNF α -mutated vectors were used (Figure 3D). These results confirm that *hsa-miR-181c* targets the 3'UTR of TNF α , mediating a down-regulated expression of the gene.

Regulation of TNF α by *hsa-miR-181c* in BM cells from HDs and FA patients

In a next set of experiments, we investigated the production of TNF α in BM cells from HDs and FA patients 48 hours after transfection with the control Pre-miR or with Pre-miR-181c. When TNF α was analyzed in untransfected BM samples from either HDs or FA patients, a very small number of cells expressed detectable levels of intracellular TNF α . Therefore, samples were activated with PMA, LPS, or R848. Activation with LPS or R848 markedly increased the proportion of TNF α -expressing cells, mainly within the CD14⁺ population, whereas the generation of TNF α -expressing CD14⁺ cells was much lower in PMA-stimulated cells (for representative analyses, see Figure 4A). When *hsa-miR-181c* was transfected into LPS- and R848-activated BM cells from a HD, moderate decreases in the intracellular levels of TNF α were observed (Figure 4B). When similar experiments were conducted with BM samples from FA-A patients, less consistent results were obtained. Whereas either LPS or R848 induced a significant TNF α overexpression in cells from 2 FA patients (FA-110 and FA-536), no TNF α overexpression was induced by these molecules on cells from a third FA patient (FA-13). In addition, whereas *hsa-miR-181c* down-regulated the expression of TNF α in LPS-activated cells,

but not in R848-activated cells, from patient FA-110, only R848-activated cells from patient FA-536 showed a down-regulated expression of TNF α (not shown). The use of lentiviral vectors carrying the *Pre-miR-181c* and the *EGFP* marker gene clarified that FA cells with a down-regulated expression of TNF α corresponded to *hsa-miR-181c*-expressing cells (supplemental Figure 3).

hsa-miR-181c transfection in BM cells from FA patients reproducibly improves the growth of FA hematopoietic progenitors in vitro

Finally, to investigate the functional consequences mediated by *hsa-miR-181c* on the growth of FA hematopoietic progenitors, BM cells from 5 FA patients without evidence of myelodysplasia or leukemia deduced from morphological and karyotypic assessment in BM aspirates were transfected with either the control Pre-miR or with Pre-miR-181c and then cultured in semisolid medium for 14 days. As shown in Figure 5A, *hsa-miR-181c* mediated a marked increase in the number of hematopoietic colonies in all tested FA BM samples. The effects of *Pre-miR-181c* were evident not only by the increased number of colonies, both myeloid and erythroid, but also by the larger size of the colonies (see representative analyses in Figure 5B). In all cases, the expression of *hsa-miR-181c* was confirmed by qPCR performed in pooled hematopoietic colonies from each patient (not shown).

Discussion

In the present study, we sought to determine the potential role of miRNAs in the hematologic manifestations of FA, a severe inherited disease associated with several cellular dysfunctions affecting the proliferation and differentiation of hematopoietic cells. Previous results from Gruber et al demonstrated that mice deficient in *Ars2*, a protein involved in proper miRNA processing, developed BM failure,³³ reinforcing our hypothesis that several miRNAs might be altered in FA. Consistent with this hypothesis, our results showed the down-regulation of 8 miRNAs in LCLs from FA patients, 3 of which (*hsa-miR-133a*, *hsa-miR-135b*, and *hsa-miR-181c*) were also down-regulated in fresh MNCs from the PB of FA patients. Interestingly, one of the miRNAs that was systematically down-regulated in FA cells, *hsa-miRNA-181c*, had TNF α , IL-1 β ,

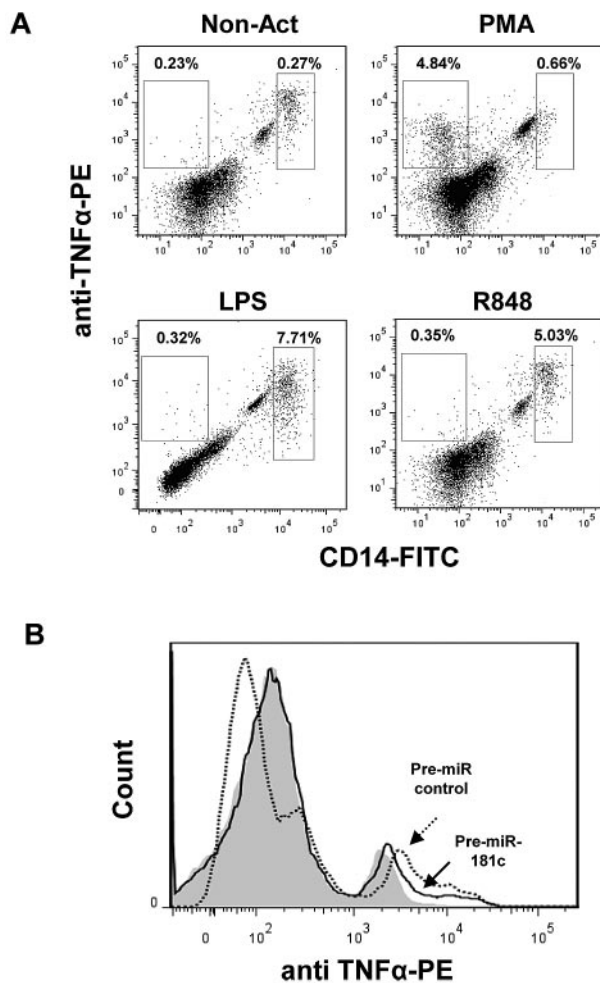


Figure 4. Down-regulated expression of TNF α in LPS-activated BM cells transfected with Pre-miR-181c. (A) Representative flow cytometric analysis showing intracellular expression of TNF α in CD14⁺ cells in fresh BM and BM cells activated with PMA, LPS, or R848. (B) Representative analysis of intracellular TNF α in LPS-activated BM cells transfected with Pre-miR control or with Pre-miR-181c. Gray histogram corresponds to nonactivated cells; empty histograms correspond to LPS-activated cells transduced with the Pre-miR control (dotted line) and with Pre-miR-181c (continuous line). Data correspond to a BM sample from an HD.

and *RAD54B* as possible target genes, although only TNF α and *IL-1 β* have been reported to be up-regulated in FA cells.^{28,31,32}

Whereas the inhibitory studies with the siCHECK2 vector showed that *hsa-miR-181c* could target the TNF α 3'UTR, this effect was not observed with the *IL-1 β* 3'UTR (Figure 3). The levels of TNF α down-regulation obtained in our luciferase experiments were similar to those described with *hsa-miR-125b*, another miRNA also capable of down-regulating TNF α .³⁴ In that study, the investigators observed that miR-125b also targets the 3'UTR of TNF α transcripts and proposed that its down-regulation in response to LPS may be required for proper TNF α production.

Because of the relevance of TNF α in the etiology of the BM failure and cancer progression in FA, we focused our next studies on the effects of *hsa-miR-181c* on the expression of TNF α in FA BM cells and also on the growth of hematopoietic progenitors from FA patients. Early studies showed that altered responses to this cytokine had a critical role in the pathogenesis of acquired aplastic anemia because of the apoptotic loss of hematopoietic stem and progenitor cells (for review, see Young and Maciejewski³⁵). Increased levels of this cytokine were found in the serum of FA patients^{36,37} and also in supernatants from LCLs^{37,38} and BM cells

from these patients.²⁸ In addition, the neutralization of the interaction of this cytokine with its receptor significantly increased the growth of BFU-E and CFU-GM progenitors from FA patients,^{28,39} which is consistent with mechanistic studies showing a deregulated apoptosis and hypersensitivity of FA BM progenitor cells exposed to TNF α .^{38,40-44} In addition to studies showing the relevance of TNF α on the etiology of FA BMF, studies in *Fancc*^{-/-} mice have shown that this cytokine provides a selective pressure for apoptosis-resistant FA cells, thus facilitating the malignant progression of FA clones with accumulated mutations.^{45,46}

Our data showing the interaction of *hsa-miR-181c* with the TNF α 3'UTR (Figure 3) are consistent with analyses indicating that this miRNA down-regulates the expression of TNF α in LCLs and primary cells from HDs and FA patients (Figure 2, Figure 4, and supplemental Figure 3). These observations, together with our data showing a reduced expression of *hsa-miR-181c* in FA cells (Figure 1), indicate that, in addition to other molecules such as MMP-7, this miRNA could be involved in the altered levels of expression/secretion of TNF α in FA cells.³¹

The functional relevance of *hsa-miR-181c* on the hematopoiesis of FA patients is apparent from our in vitro culture experiments conducted with BM cells from FA patients (Figure 5). As was the case in cultures of FA BM cells treated with TNF α fusion protein inhibitors,^{28,39} our data clearly show (Figure 5) that the expression of *hsa-miR-181c* on the BM of a FA patient improved the growth of myeloid and erythroid progenitors significantly, probably because of the down-regulated expression of TNF α in FA progenitor and/or mature cells (ie, CD14⁺ cells present in transfected BM or generated during the colony growth).

The fact that BM samples from FA patients corresponding to 3 different complementation groups (FA-A, FA-G, and FA-J) showed similar improvements in colony growth after the ectopic expression of *hsa-miR-181c* suggests that the down-regulated expression of this miRNA in FA patients should be involved, either directly or indirectly, in the impaired growth of their hematopoietic progenitors independent of the FA complementation group. In addition, the observation of an improved colony growth in cultures of BM cells from patient FA-13, whose TNF α levels were low even after LPS or R848 activation, suggest that this miRNA might also target other negative regulators involved in the growth of hematopoietic progenitors. Our results, together with the fact that miRNAs can be modified to improve their stability after in vivo infusion,⁴⁷⁻⁴⁹ open the possibility of using miRNAs, in particular *hsa-miR-181c*, for the treatment of the BM failure in FA patients, as has already been done with TNF α inhibitors.⁵⁰

Interestingly, when BM cells from a FA patient with acute myeloid leukemia were transfected with *hsa-miR-181c*, no increase in the number of colonies was observed (data not shown). Although further studies are necessary to confirm this observation, it is significant that studies conducted in *Fancc*^{-/-} mice showed that malignant clones were not sensitive to TNF α ,^{45,46} indicating that these malignant clones may have developed mechanisms of TNF α resistance and/or degradation.

The mechanisms accounting for the decreased expression of different miRNAs, including *hsa-miR-181c*, in FA cells still remains unclear. Epigenetic modifications of genes encoding for these miRNAs, such as promoter hypermethylation or histone modifications,⁵¹⁻⁵³ may have a critical role in this effect. Moreover, previous results in studies of gastric carcinoma have shown that *hsa-miR-181c* can be down-regulated by methylation.³⁰ However, methylation analyses conducted in LCLs from HDs and FA-A patients showed a similar heavy methylation of CpG sites located

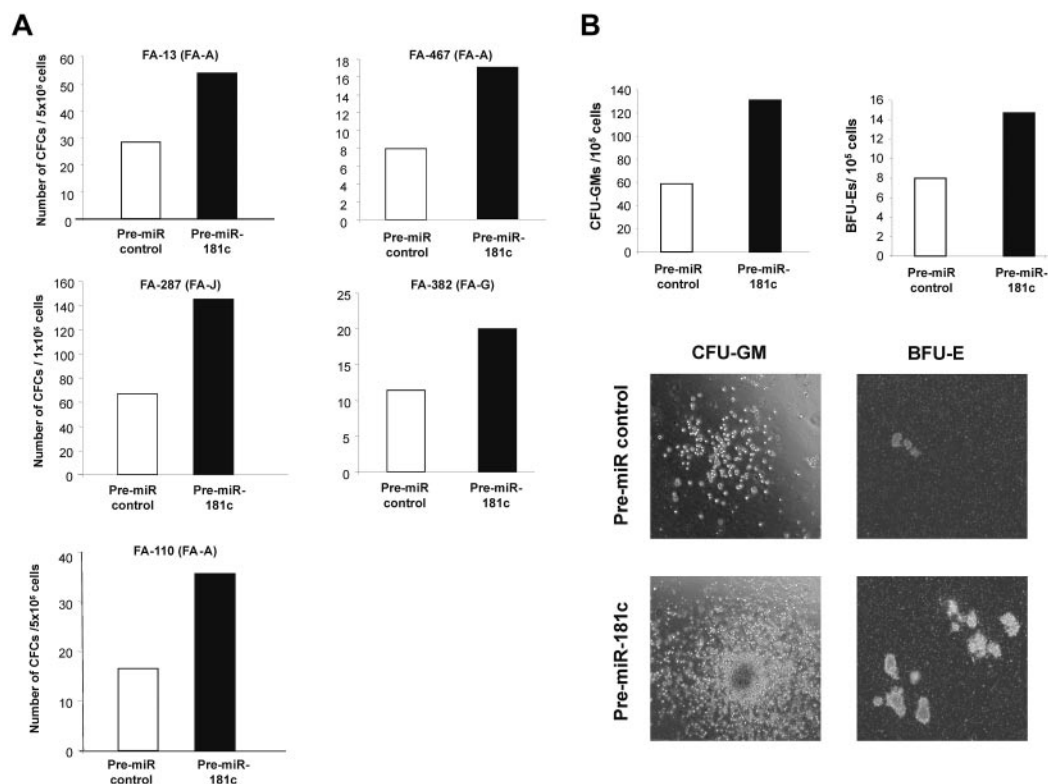


Figure 5. Pre-miR-181c improves the clonogenicity of hematopoietic progenitors from FA patients. (A) Analysis of the number of hematopoietic progenitors from FA patients cultured in methylcellulose 48 hours after transfection with a Pre-miR control (white bars) or with Pre-miR-181c (black bars). (B) Representative analysis of CFU-GM and BFU-E colonies corresponding to patient FA-287. Photographs are from patient FA-13.

near the *hsa-miR-181c* and of the CpG dinucleotides located in the mature *hsa-miR-181c*. These results strongly suggest that the methylation of these CpG sites is not the mechanism that accounts for the down-regulation of this miRNA in FA cells.

The study from O'Connell et al⁵ showing that *hsa-miR-181c* is enriched in mouse HSCs and human CB CD34⁺ cells is of particular interest because of the reduced expression of this miRNA in FA hematopoietic cells and its role in both TNF α down-regulation and hematopoietic progenitor cell growth. In this context, it would be of interest to determine *hsa-miR-181c* levels in the very rare population of FA CD34⁺ and HSCs. Similarly, understanding the involvement of this miRNA in the homing and repopulating properties of FA-HSCs would be highly relevant, considering the data by O'Connell et al showing that the ectopic expression of this miRNA impaired the competitive repopulating ability of BM cells from healthy mice.

In the present study, we have shown for the first time that FA hematopoietic cells are characterized by a down-regulated signature of several miRNAs, and have demonstrated that one of these down-regulated miRNAs, *hsa-miR-181c*, interacts with the 3'UTR of TNF α , inhibiting its expression and toxic effects in hematopoietic progenitors from FA patients. These observations offer new clues to understand the biologic basis of BM failure in FA patients and may help in the development of new therapeutic strategies for the treatment of this severe disease.

Acknowledgments

The authors thank Aurora de La Cal and Sergio Losada (Centro de

Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras) for technical assistance and the Fundación Marcelino Botín for promoting translational research at the División de Hematopoyesis y Terapia Génica at the Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

This study was supported by grants from the European program 7FWP, Health (PERSIST; grant 222878); the Ministry of Science and Innovation Programa de Fomento de Cooperación Científica Internacional (110-90.1) and Plan Nacional de Salud y Farmacia (SAF 2009-07164); and Fondo de Investigaciones Sanitarias, ISCIII (Programa RETICS-RD06/0010/0015).

Authorship

Contribution: P.R. and X.A. designed the research, performed the experiments, and wrote the manuscript; L.G., R.B., L.A., E.S.J.-E., and M.G. performed the experiments; I.B. and J.A.C. contributed vital new reagents; and F.P. and J.A.B. designed the research and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Juan A. Bueren, Hematopoiesis and Gene Therapy Division, CIEMAT/CIBERER, Avenida Complutense 22, 28040 Madrid, Spain; e-mail: juan.bueren@ciemat.es.

References

- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010; 466(7308):835-840.
- Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood*. 2006; 108(12):3646-3653.
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004;303(5654):83-86.
- Georgantas RW, 3rd Hildreth R, Morisot S, et al. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(8):2750-2755.
- O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Gibson WS, Balazs AB, Baltimore D. MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14235-14240.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-15529.
- Costinean S, Zaneni N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(18):7024-7029.
- O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med*. 2008;205(3):585-594.
- Han YC, Park CY, Bhagat G, et al. microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. *J Exp Med*. 2010;207(3):475-489.
- Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003;101(4):1249-1256.
- Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood*. 2003;101(3):822-826.
- Moldovan GL, D'Andrea AD. How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annu Rev Genet*. 2009;43:223-249.
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, et al. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell*. 2001; 7(2):249-262.
- Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, et al. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell*. 2007;129(2):289-301.
- Niedernhofer LJ, Lalai AS, Hoeijmakers JH. Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell*. 2005;123(7):1191-1198.
- Kratz K, Schopf B, Kaden S, et al. Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell*. 2010;142(1):77-88.
- MacKay C, Declais AC, Lundin C, et al. Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell*. 2010;142(1):65-76.
- Smogorzewska A, Desetty R, Saito TT, et al. A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Mol Cell*. 2010;39(1): 36-47.
- Liu T, Ghosal G, Yuan J, Chen J, Huang J. FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA inter-strand cross-link repair. *Science*. 2010; 329(5992):693-696.
- Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat Genet*. 2011; 43(2):142-146.
- Stoepker C, Hain K, Schuster B, et al. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nat Genet*. 2011;43(2):138-141.
- Cybulski KE, Howlett NG. FANCP/SLX4: A Swiss Army knife of DNA interstrand crosslink repair. *Cell Cycle*. 2011;10(11):1757-1763.
- Auerbach AD. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp Hematol*. 1993; 21(6):731-733.
- Jacome A, Navarro S, Rio P, et al. Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients. *Mol Ther*. 2009;17(6):1083-1092.
- Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer*. 2006;5:29.
- Vilas-Zornoza A, Agirre X, Martin-Palanco V, et al. Frequent and simultaneous epigenetic inactivation of TP53 pathway genes in acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2011;6(2):e17012.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*. 1998;72(11):8463-8471.
- Dufour C, Corcione A, Svahn J, et al. TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood*. 2003;102(6):2053-2059.
- Lamana B, Albella B, Rodríguez F, et al. Conclusions of a national multicentric intercomparative study of in vitro cultures of human hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 23(4):373-380.
- Hashimoto Y, Akiyama Y, Otsubo T, Shimada S, Yuasa Y. Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2010;31(5):777-784.
- Briot D, Mace-Aime G, Subra F, Rosselli F. Aberrant activation of stress-response pathways leads to TNF-alpha oversecretion in Fanconi anemia. *Blood*. 2008;111(4):1913-1923.
- Ibáñez A, Rio P, Casado JA, Bueren JA, Fernandez-Luna JL, Pipaon C. Elevated levels of IL-1beta in Fanconi anaemia group A patients due to a constitutively active phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway are capable of promoting tumour cell proliferation. *Biochem J*. 2009;422(1): 161-170.
- Gruber JJ, Zatechka DS, Sabin LR, et al. Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation. *Cell*. 2009; 138(2):328-339.
- Tili E, Michaille JJ, Cimino A, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopoly-saccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*. 2007;179(8):5082-5089.
- Young NS, Maciejewski J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med*. 1997; 336(19):1365-1372.
- Schultz JC, Shahidi NT. Tumor necrosis factor-alpha overproduction in Fanconi's anemia. *Am J Hematol*. 1993;42(2):196-201.
- Rosselli F, Sanceau J, Gluckman E, Wietzerbin J, Moustacchi E. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor alpha. *Blood*. 1994;83(5):1216-1225.
- Vanderwerf SM, Svahn J, Olson S, et al. TLR8-dependent TNF-(alpha) overexpression in Fanconi anemia group C cells. *Blood*. 2009;114(26): 5290-5298.
- Jacome A, Navarro S, Casado JA, et al. A simplified approach to improve the efficiency and safety of ex vivo hematopoietic gene therapy in fanconi anemia patients. *Hum Gene Ther*. 2006;17(2): 245-250.
- Haneline LS, Broxmeyer HE, Cooper S, et al. Multiple inhibitory cytokines induce deregulated progenitor growth and apoptosis in hematopoietic cells from Fac-/- mice. *Blood*. 1998;91(11): 4092-4098.
- Otsuki T, Nagakura S, Wang J, Bloom M, Grompe M, Liu JM. Tumor necrosis factor-alpha and CD95 ligation suppress erythropoiesis in Fanconi anemia C gene knockout mice. *J Cell Physiol*. 1999; 179(1):79-86.
- Rathbun RK, Christianson TA, Faulkner GR, et al. Interferon-gamma-induced apoptotic responses of Fanconi anemia group C hematopoietic progenitor cells involve caspase 8-dependent activation of caspase 3 family members. *Blood*. 2000; 96(13):4204-4211.
- Zhang X, Li J, Sejas DP, Rathbun KR, Bagby GC, Pang Q. The Fanconi anemia proteins functionally interact with the protein kinase regulated by RNA (PKR). *J Biol Chem*. 2004;279(42):43910-43919.
- Sejas DP, Rani R, Qiu Y, et al. Inflammatory reactive oxygen species-mediated hemopoietic suppression in Fancc-deficient mice. *J Immunol*. 2007;178(8):5277-5287.
- Li X, Le Beau MM, Ciccone S, et al. Ex vivo culture of Fancc -/- stem/progenitor cells predisposes cells to undergo apoptosis and surviving stem/progenitor cells display cytogenetic abnormalities and an increased risk of malignancy. *Blood*. 2005;105(9):3465-3471.
- Li J, Sejas DP, Zhang X, et al. TNF-alpha induces leukemic clonal evolution ex vivo in Fanconi anemia group C murine stem cells. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3283-3295.
- Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res*. 2010;70(18):7027-7030.
- Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, et al. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther*. 2010;18(1):181-187.
- Liu C, Kelnar K, Liu B, et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med*. 2011;17(2):211-215.
- Dufour C, Svahn J. Fanconi anaemia: new strategies. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41 Suppl 2:S90-95.
- Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*. 2007;61(5 pt 2):24R-29R.
- Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 2006; 9(6):435-443.
- Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC, Benz CC. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res*. 2006; 66(3):1277-1281.

Mutations in *ERCC4*, Encoding the DNA-Repair Endonuclease XPF, Cause Fanconi Anemia

Massimo Bogliolo,^{1,2,10} Beatrice Schuster,^{3,10} Chantal Stoepker,⁴ Burak Derkunt,⁵ Yan Su,⁵ Anja Raams,⁶ Juan P. Trujillo,¹ Jordi Minguillón,¹ María J. Ramírez,^{1,2} Roser Pujol,^{1,2} José A. Casado,^{2,7} Rocío Baños,^{2,7} Paula Rio,^{2,7} Kerstin Knies,³ Sheila Zúñiga,⁸ Javier Benítez,^{2,9} Juan A. Bueren,^{2,7} Nicolaas G.J. Jaspers,⁶ Orlando D. Schärer,⁵ Johan P. de Winter,⁴ Detlev Schindler,^{3,*} and Jordi Surralles^{1,2,*}

Fanconi anemia (FA) is a rare genomic instability disorder characterized by progressive bone marrow failure and predisposition to cancer. FA-associated gene products are involved in the repair of DNA interstrand crosslinks (ICLs). Fifteen FA-associated genes have been identified, but the genetic basis in some individuals still remains unresolved. Here, we used whole-exome and Sanger sequencing on DNA of unclassified FA individuals and discovered biallelic germline mutations in *ERCC4* (*XPF*), a structure-specific nuclease-encoding gene previously connected to xeroderma pigmentosum and segmental XFE progeroid syndrome. Genetic reversion and wild-type *ERCC4* cDNA complemented the phenotype of the FA cell lines, providing genetic evidence that mutations in *ERCC4* cause this FA subtype. Further biochemical and functional analysis demonstrated that the identified FA-causing *ERCC4* mutations strongly disrupt the function of XPF in DNA ICL repair without severely compromising nucleotide excision repair. Our data show that depending on the type of *ERCC4* mutation and the resulting balance between both DNA repair activities, individuals present with one of the three clinically distinct disorders, highlighting the multifunctional nature of the XPF endonuclease in genome stability and human disease.

Fanconi anemia (FA) is characterized by bone marrow failure (BMF), congenital malformations, hypersensitivity to DNA interstrand crosslink (ICL)-inducing agents, chromosome fragility, and a high susceptibility to cancer. Since the discovery of the first FA-associated gene 20 years ago, all together, 15 genes associated with FA have been identified; these include *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1* (*BRCA2*), *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG* (*XRCC9*), *FANCI*, *FANCJ* (*BRIP1*), *FANCL* (*PHF9*), *FANCM*, *FANCN* (*PALB2*), *FANCO* (*RAD51C*), and *FANCP* (*SLX4*)^{1,2} (MIM 227650, 300514, 227645, 605724, 227646, 600901, 603467, 614082, 609053, 609054, 614083, 614087, 610832, 613390, and 613951, respectively). Studies to unravel the genetic basis of this rare disorder uncovered a genome-maintenance pathway that protects dividing cells against replication-blocking DNA lesions. To identify additional FA-associated genes, we used the SOLiD 4 platform for whole-exome sequencing on peripheral-blood DNA from a Spanish FA individual (FA104) who was previously excluded from all known FA complementation groups (this study was approved by the Institutional Committee on Ethical Research in Human Samples, and proper informed consent was obtained). FA104 was born to unrelated parents and was diagnosed neonatally with a malformative syndrome suggestive of FA, the symptoms of which included bilateral absent thumbs, microsomia, esophageal atresia, a ventrally translocated anus, and dysplastic and

low-set ears. She did not show any dermatological abnormality such as skin hyperpigmentation, photosensitivity, sunlight-induced scarring, or atrophy. FA104 developed BMF at the age of 2 years and died as a result of a hemorrhagic shock after bone marrow transplantation at the age of 4 years. A positive chromosome-breakage test unambiguously confirmed the FA diagnosis: 92% of the cells showed on average 4.4 diepoxybutane (DEB)-induced breaks. Lymphoblasts from this individual were hypersensitive to mitomycin-C (MMC) and melphalan but were insensitive to the topoisomerase I inhibitor camptothecin and the PARP inhibitor KU58948 (data not shown) and showed normal FANCD2 monoubiquitination and RAD51 focus formation.³ This suggests a defect downstream within the FA pathway, which does not involve homologous recombination. On the basis of a recessive mode of inheritance, exome sequencing identified 17 candidate disease genes for FA104 (Table S1, available online); of these, *ERCC4* (MIM 133520; also known as *XPF*) immediately caught our attention given the involvement of the XPF-ERCC1-structure-specific nuclease in ICL repair.⁴ Both *ERCC4* mutations were predicted to be pathogenic: a 5 bp deletion in exon 8 (c.1484_1488delCTCAA) was predicted to lead to a frameshift and a premature stop codon (p.Thr495Asnfs*6), and a missense mutation in exon 11 (c.2065C>A [p.Arg689Ser]; RefSeq accession numbers NG_011442.1, NM_005236.2, and NP_005227.1) was

¹Genome Instability and DNA Repair Group, Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain; ²Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain; ³Department of Human Genetics, University of Würzburg, D-97074 Würzburg, Germany; ⁴Department of Clinical Genetics, VU University Medical Center, 1081 BT Amsterdam, the Netherlands; ⁵Department of Pharmacological Sciences and Chemistry, Stony Brook University, Stony Brook, NY 11794-3400, USA; ⁶Department of Genetics, Erasmus University Medical Center, 3015 GE Rotterdam, the Netherlands; ⁷Hematopoiesis and Gene Therapy Division, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, 28040 Madrid, Spain; ⁸Department of Bioinformatics, Sistemas Genómicos SL, 46980 Valencia, Spain; ⁹Human Genetics Group, Spanish National Cancer Center, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, E-28029 Madrid, Spain

¹⁰These authors contributed equally to this work

*Correspondence: jordi.surralles@uab.es (J.S.), schindler@biozentrum.uni-wuerzburg.de (D.S.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.04.002>. ©2013 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

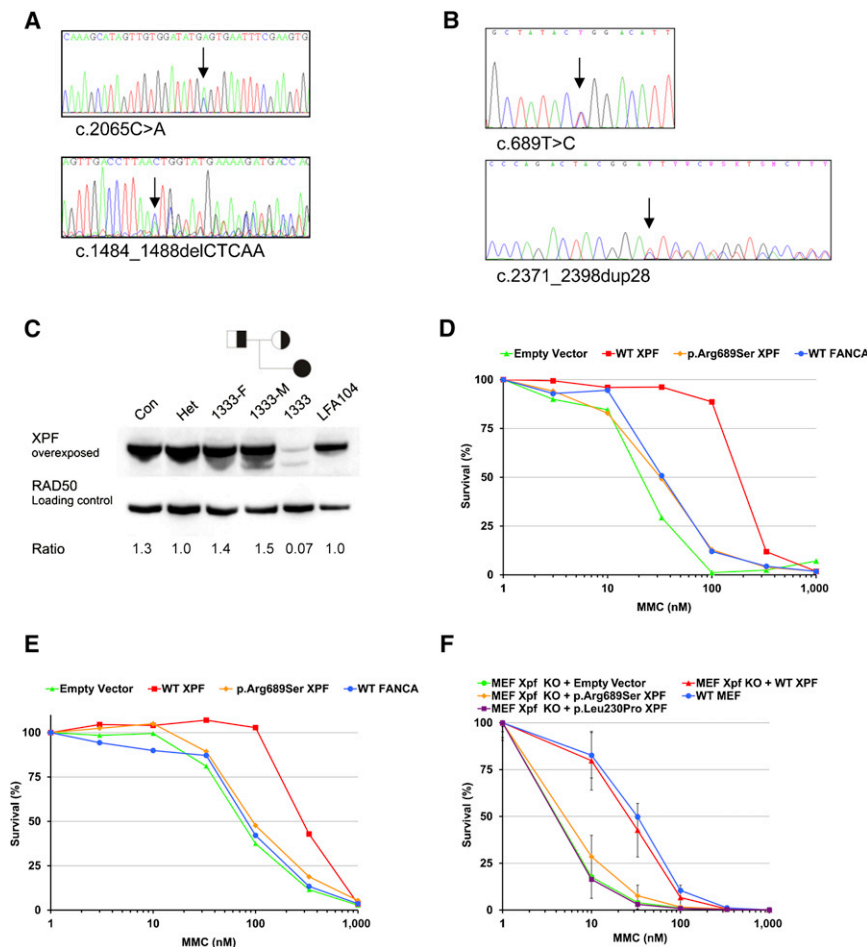


Figure 1. *ERCC4* Mutations and XPF Deficiency in FA Individuals

(A) Sequence analysis of blood DNA from FA104 revealed a missense mutation in exon 11 (c.2065C>A [p. Arg689Ser]) (upper panel) and a 5 bp deletion in exon 8 leading to a frameshift and premature termination of translation (c.1484_1488delCTCAA [p. Thr495Asnfs*6]) (lower panel).

(B) Sequence analysis of blood DNA from 1333 revealed a missense mutation in exon 4 (c.689T>C [p. Leu230Pro]) (upper panel) and a 28 bp duplication in exon 11 (lower panel) leading to a frameshift and a premature stop codon (c.2371_2398dup28 [p. Ile800Thrfs*24]).

(C) Immunoblot analysis showing XPF expression in lymphoblasts from 1333 and FA104. Lymphoblasts from a healthy individual (Con), the parents of 1333 (1333-F and 1333-M), and an unrelated *ERCC4* mutation carrier (Het) were used as controls. XPF levels are expressed as a ratio relative to the loading control (RAD50).

(D) Genetic complementation of MMC sensitivity in FA104 lymphoblasts by wild-type XPF, but not by p.Arg689Ser altered XPF. Site-directed mutagenesis was used for introducing point mutations into the pWPKL-XPF hemagglutinin (HA)-tagged plasmid with the QuickChange method (Stratagene) as described.⁵ Lentiviral supernatant production and transduction were done as previously described,⁶ and cells were grown for 10 days in the presence of MMC. Data represent a typical result of at least three independent experiments.

(E) Genetic complementation of MMC sensitivity of 1333 lymphoblasts by wild-type XPF (experiments were performed as in D).

(F) MMC-induced growth inhibition of *Ercc4*-knockout MEFs transduced with lentiviral particles coding for GFP (negative control vector), wild-type XPF, and p.Arg689Ser and p.Leu230Pro altered XPF. Data represent means and SD of at least three independent experiments.

predicted to change a highly conserved arginine within the nuclease active site of XPF. Sanger sequencing on blood DNA confirmed these mutations (Figure 1A) and their correct segregation (data not shown). In MMC-resistant FA104 lymphoblasts (FA104R) obtained after long-term exposure to a low dose of MMC, we detected a mutation that restored the *ERCC4* reading frame (Figure S1A), supporting the notion that MMC sensitivity is due to *ERCC4* mutations. Consistently, XPF levels were reduced in FA104 lymphoblasts but were normalized in the reverted FA104R lymphoblasts (Figure S1B). Immunoblotting did not detect a truncated XPF, indicating that only the p.Arg689Ser altered XPF was present in the FA104 cell line.

Sanger sequencing on 18 unclassified FA individuals from Germany revealed biallelic *ERCC4* mutations in another individual (1333). Individual 1333 was born in 2002 and was unambiguously diagnosed with FA at the age of 5 years as a result of multiple FA-related features, such as perinatal growth retardation, short stature, pronounced microcephaly, café-au-lait spots, an ostium-primum defect, biliary atresia with fibrosis of the liver, BMF,

and a positive chromosome-fragility test (0.2, 6.7, and 9.4 breaks per cell at 0, 50, and 100 ng/ml MMC, respectively). Individual 1333 is redheaded and has pale skin color, but no spontaneous or UV-light-induced skin lesions were reported at the age of 10 years. Similar to those of FA104, lymphoblasts from individual 1333 were normal with regard to FANCD2 monoubiquitination and RAD51 focus formation and were sensitive to MMC and melphalan but insensitive to the topoisomerase I inhibitor camptothecin and to the PARP inhibitor KU58948 (data not shown). Individual 1333 carries a 28 bp duplication in exon 11 of the maternal allele (c.2371_2398dup28 [p. Ile800Thrfs*24]; Figure 1B), and this duplication is predicted to result in a truncated XPF that lacks the double helix-hairpin-helix (HhH₂) domain involved in heterodimerization with ERCC1 and DNA binding.⁷ The paternal allele contains a missense mutation that changes a highly conserved amino acid residue within the helicase-like domain (c.689T>C [p. Leu230Pro]; Figure 1B). Immunoblot analysis showed that a missense altered XPF and a truncated 90–95 kDa XPF are present at very low levels

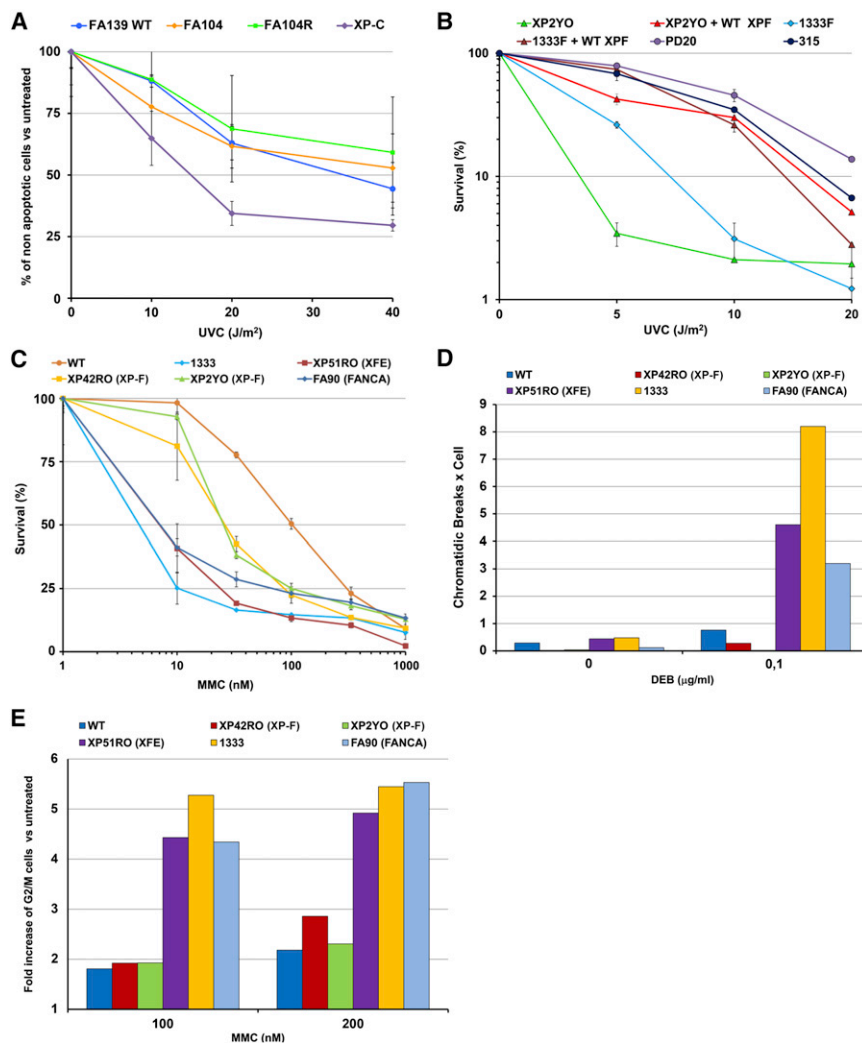


Figure 2. UV-Light and ICL Sensitivities of *ERCC4* Mutants Leading to FA

(A) UVC-light-induced apoptosis in FA104 lymphoblasts. Cells were analyzed for UVC-light-induced apoptosis 24 hr after irradiation with the use of the Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche). Data represent means and SD of at least three independent experiments.

(B) UVC-light-induced growth inhibition of human *ERCC4*-deficient immortal fibroblast cell lines (from XP individual XP2YO and FA individual 1333) transduced with lentiviral particles carrying cDNA coding for wild-type XPF. The results are expressed as a percentage of viable UVC-light-treated cells relative to untreated controls. Data represent means and SD of two independent experiments.

(C) MMC sensitivity of human *ERCC4*-deficient primary fibroblasts from XP, FA, and XFE individuals (XP42RO, 1333, and XP51RO, respectively). Data represent means and SD of two independent experiments.

(D) DEB-induced chromosome-fragility test in human *ERCC4*-deficient primary fibroblasts from XP, FA, and XFE individuals (XP42RO, 1333, and XP51RO, respectively).

(E) MMC-induced G2/M cell-cycle arrest in the same cells as in (D). Experiments presented in (D) and (E) were performed as reported earlier.¹⁰

(Figure 1C). As expected, the truncated XPF was undetectable with an antibody against the C-terminal HhH₂ domain of XPF (amino acids 866–916, data not shown). Interestingly, the truncated XPF was absent in a MMC-resistant lymphoblastoid cell line (1333R) generated by long-term exposure to MMC, and near-normal XPF levels were detected in this reverted cell line (Figure S1C). PCR amplification and sequence analysis revealed that the 28 bp duplication had disappeared in 1333R (Figure S1D) and had thus restored the wild-type sequence. Both the inherited duplication and the somatic reversion might have been triggered by an inverted 5 bp repeat flanking the region.

Genetic complementation of MMC sensitivity in lymphoblasts from both FA individuals was achieved by lentiviral transduction of wild-type *ERCC4* cDNA (Figures 1D and 1E). In addition, we expressed wild-type and mutant human *ERCC4* cDNAs in embryonic fibroblasts (MEFs) from *Ercc4* (*Xpf*)-null mice. We found that ectopic expression of *ERCC4* mutants encoding p.Leu230Pro and p.Arg689Ser did not complement MMC sensitivity of these MEFs (Figure 1F), providing additional evidence that the

ERCC4 missense mutations found in both FA individuals inactivate XPF. The genetic and functional data show that mutations in *ERCC4* cause FA in two unrelated nonconsanguineous individuals. Because mutations in *ERCC4* cause an additional FA subtype (FA-Q), we propose *FANCA* as an alias for *ERCC4*.

ERCC4 mutations have been linked to the skin-photo-sensitive and nucleotide excision repair (NER)-deficient disorders xeroderma pigmentosum (XP [MIM 278700, 610651, 278720, 278730, 278740, 278760, 278780, and 278750])⁸ and XFE progeroid syndrome (MIM 610965),⁹ and we therefore tried to understand why the identified *ERCC4* variants specifically lead to FA. We hypothesized that these mutants cause an FA phenotype because of a strong deficiency in ICL repair but have sufficient NER activity to prevent clinically relevant skin photosensitivity and other NER-related features. Compared to an XP complementation group C (XP-C) lymphoblast line, FA104 lymphoblasts were indeed not sensitive to UVC light (Figure 2A). Given that UV-light survival experiments are challenging in lymphoblastoid cell lines, we studied skin fibroblasts from individual 1333 (FA104 fibroblasts were not available) and found that the UV-light sensitivity in FA individual 1333 was milder than that in XP complementation group F (XP-F) individual XP2YO (Figure 2B).

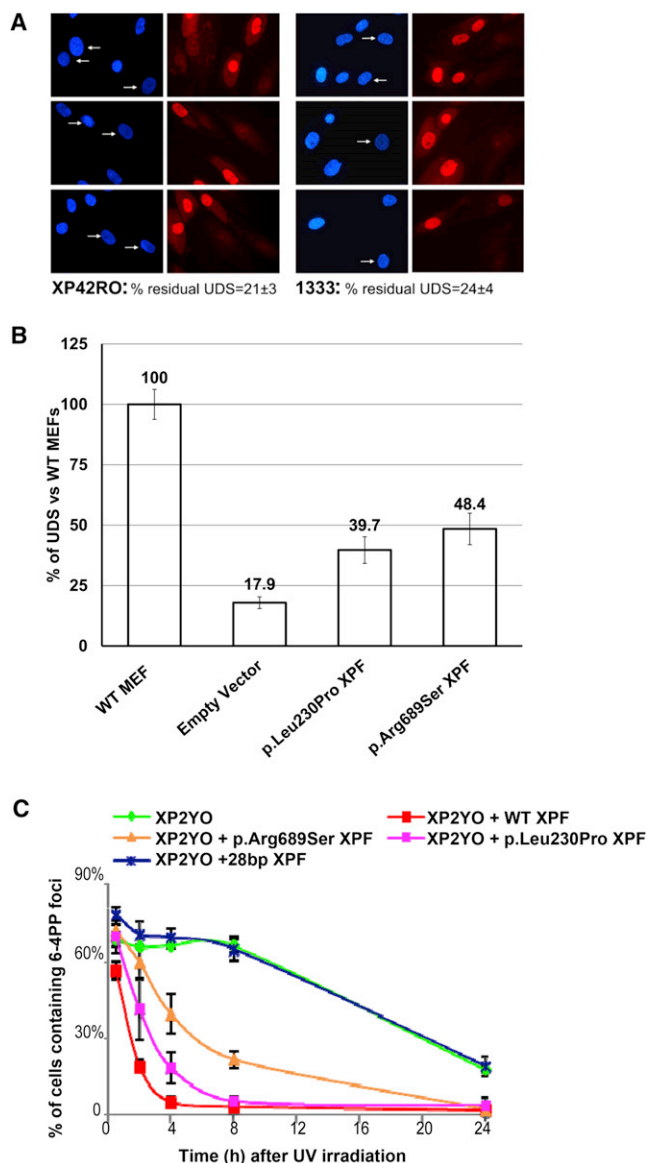


Figure 3. NER Analysis of *ERCC4* Mutants In Vivo

(A and B) In primary fibroblasts, unscheduled DNA synthesis (UDS) representing global NER activity was measured with 5-ethynyl-deoxyuridine grossly as previously described.¹²

(A) XP-F (XP42RO) and FA (1333) cells (arrows) were compared to mixed-in normal fibroblasts preloaded with polystyrene microbeads (no arrows), used as an internal control. UDS signal was quantified from 20–40 random XP-F or FA G1/G2 nuclei and expressed as a percentage of control wild-type cells.

(B) UDS signals in *Ercc4*^{-/-} MEFs measured as in (A) are expressed as a percentage of control wild-type MEFs. *Ercc4*^{-/-} cells were stably expressing an empty vector or one of various *ERCC4* cDNAs (wild-type or encoding p.Leu230Pro or p.Arg689Ser).

(C) Repair kinetics of UV-light-induced DNA damage by FA-specific *ERCC4* mutants in *ERCC4*- and NER-deficient human cells (XP2YO). Cells expressing wild-type XPF, p.Arg689Ser or p.Leu230Pro altered XPF, or XPF resulting from the 28 bp duplication were locally irradiated with UV light, cultured for the indicated times, fixed and stained for 6-4 PPs, and tagged with HA with the use of specific antibodies. Data represent the percentage of cells with 6-4 PP spots at various time points; means and SD of at least two independent experiments are shown. For each experiment, 100 cells were counted.

In addition, the FA-specific XPF alterations p.Leu230Pro and p.Arg689Ser rescued 100% of the UVC sensitivity of XP2YO fibroblasts (Figure S2A) and approximately 80% of the UVC-light sensitivity of *Ercc4*-null MEFs (Figure S2B) but were both unable to complement MMC sensitivity (Figure 1F). Furthermore, XFE and 1333 fibroblasts responded typically like FA cells upon MMC-induced survival (Figure 2C), DEB-induced chromosome breakage (Figure 2D), and MMC-induced G2-phase arrest (Figure 2E), whereas XP-F cells showed milder MMC sensitivity and lacked DEB-induced chromosome fragility and MMC-induced cell-cycle arrest (Figure 2C–2E). Previous experiments in Chinese hamster ovary cells also demonstrated that the XFE-specific p.Arg153Pro altered XPF does not rescue MMC or UV-light sensitivity.¹¹ Therefore, we conclude that XP, XFE, and FA cells with *ERCC4* mutations clearly have a distinct response to UV light and MMC (Table S2).

To further investigate the extent of NER deficiency in the FA-affected individuals, we measured UV-light-induced unscheduled DNA synthesis (UDS) in primary skin fibroblasts from individual 1333 and from an XP-F individual (XP42RO) with mild clinical UV-light sensitivity and found $24 \pm 4\%$ and $21 \pm 3\%$ residual UDS activity, respectively (Figure 3A). We also determined UDS in *Ercc4*-null MEFs expressing the FA-specific XPF alterations p.Leu230Pro or p.Arg689Ser. The levels of UDS activity were 39.7% and 48.4% of the normal mean for p.Leu230Pro and p.Arg689Ser altered XPF, respectively (Figure 3B), enough to complement 80% of UVC-light sensitivity of these MEFs (Figure S2B). In XPF-deficient human XP2YO fibroblasts, p.Leu230Pro and p.Arg689Ser altered XPF rather efficiently corrected the defective removal of 6-4 photoproducts (PPs) at sites of local UV damage (Figure 3C). In contrast, XP2YO cells expressing the *ERCC4* mutant with the 28 bp duplication were completely deficient in NER activity, as predicted from the disruption of the ERCC1- and DNA-binding domain of this truncated protein. The studies presented in Figures 2 and 3 demonstrate that FA cells with *ERCC4* mutations are fully deficient in ICL repair but retain significant levels of NER activity.

Cell lines from XP-F individuals show a characteristic failure of the altered XPF to properly translocate to the nucleus through aggregation of the protein in the cytoplasm.¹¹ This feature is evident for XP-causing mutations and accentuated in cells from the individual with XFE syndrome. However, FA-causing XPF missense altered proteins can actually translocate to the nucleus, where they are recruited to sites of active NER (Figures S3A and S3B) and can interact with SLX4 and ERCC1 (Figures S3C and S3D). These results might be functionally important, given that a recent article reports that SLX4 interaction with XPF is crucial for ICL repair and that SLX4-knockout mice phenocopy FA.¹³ Using *Xenopus* extracts, J.C. Walter's group reported that the FA upstream pathway genes are required to regulate a nuclease that makes DNA incisions near the ICL.¹⁴ Given that FA-specific altered XPF proteins can

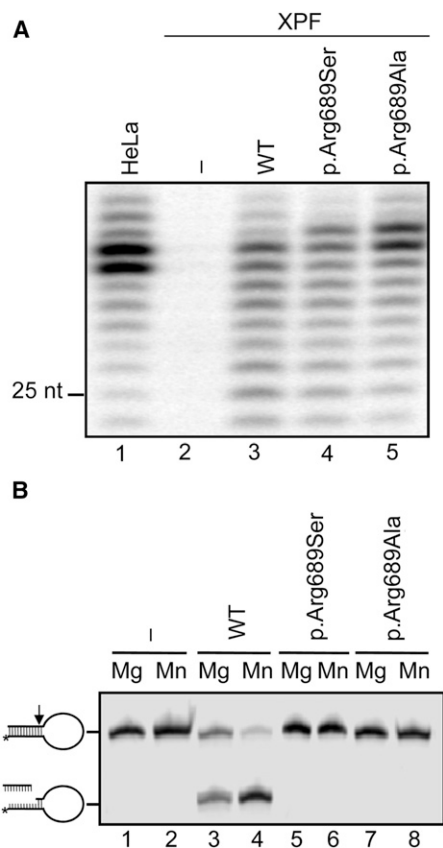


Figure 4. Nuclease Activity of Altered XPF

(A) NER activity of wild-type and altered ERCC1-XPF dimer. A plasmid containing a site-specific 1,3-intrastrand cis-Pt DNA crosslink was incubated with whole-cell extracts from HeLa cells or XPF-deficient cells (XP2YO) complemented with recombinant ERCC1-XPF purified from Sf9 insect cells as reported.¹³ The excised DNA fragments of 24–32 nucleotides are shown. The position of a 25-mer is indicated.

(B) Incision of a stem-loop substrate with wild-type and altered XPF. The 3' Cy5-labeled substrate was incubated with recombinant ERCC1-XPF in the presence of 2 mM MgCl₂ or 0.4 mM MnCl₂, and the products were analyzed by denaturing PAGE. The incision reaction was performed essentially as described earlier.^{5,11}

reach the site of damage, we then investigated their ability to cleave DNA. For this aim, the p.Arg689Ser altered XPF was purified as a heterodimer with ERCC1 as previously described.⁵ Subsequently, NER reactions were performed with the purified altered protein, extracts from XPF-deficient XP2YO cells, and a plasmid containing an NER substrate (1,3-cisplatin intrastrand crosslink).¹⁵ Consistent with the functional data above, the purified heterodimer composed of ERCC1 and p.Arg689Ser XPF is proficient in the excision step of NER similarly to wild-type XPF, given that it restored the ability to cleave and remove the site-specific intrastrand crosslink from the plasmid in XP2YO cell extracts (Figure 4A). Nevertheless, the excision reaction is not perfect given that the excised fragments are, on average, 1 nucleotide longer than expected from a normal reaction with wild-type-XPF-ERCC1 dimer (Figure 4A, lane 4). We also performed in vitro nuclease

activity assays with purified ERCC1-p.Arg689Ser-XPF and ERCC1-p.Arg689Ala-XPF on a stem-loop model DNA substrate. Unlike wild-type XPF and altered XPF proteins causing XP (p.Arg799Trp) or XFE progeroid syndrome (p.Arg153Pro),¹¹ p.Arg689Ser XPF is unable to cleave such a substrate (Figure 4B), indicating that the nuclease-type activity of p.Arg689Ser XPF is grossly abnormal. Unfortunately, we could not perform these biochemical experiments with the p.Leu230Pro altered XPF because we were unable to express and purify ERCC1-p.Leu230Pro-XPF as a result of its low stability and tendency to aggregate. We finally checked whether the FA-specific altered XPF proteins ectopically expressed in *Erc4*-null MEFs can perform the incision step of ICL repair. Both p.Leu230Pro and p.Arg689Ser altered XPF completely restored the incision defect of *Erc4*-null MEFs, as measured by the COMET assay (data not shown), but the cells remained hypersensitive to ICLs (Figure 1F). Although additional biochemical experiments are required, our results suggest that the ICL sensitivity of individuals FA104 and 1333 is not directly linked to the absence of XPF nuclease activity. It seems unlikely that the defect is a downstream step of homologous recombination because FA104 and 1333 cells are not sensitive to PARP inhibitors and are normal in Rad51 focus formation. Given that the nuclease activity of the FA-specific p.Arg689Ser altered XPF is grossly abnormal, it is tempting to speculate that the ICL-unhooking step in these FA cells leaves an intermediate aberrant substrate that is irreparable by subsequent ICL-repair factors.

Our genetic, biochemical, and functional studies, along with the characterization of previous *ERCC4* mutations causing XP-F and XFE, provide a model for the mechanistic understanding of how mutations in *ERCC4* lead to three distinct diseases (Table S2). Most of the presently known XP-F individuals suffer from a relatively mild form of XP.¹⁶ Cells from these individuals have a reduced level of XPF in the nucleus because the altered XPF has a tendency to aggregate in the cytoplasm.¹¹ This reduced level of nuclear XPF is insufficient to mediate complete NER, but it still has enough ICL-repair-specific functions to prevent chromosome fragility, cell-cycle arrest, and subsequent FA clinical manifestations. A second set of *ERCC4* mutations, characterized in this study, allow localization of the protein to the nucleus, where they exert a certain level of NER activity but are fully deficient in ICL repair. p.Arg689Ser XPF is a stable and NER-proficient protein with an active site structure that prevents it from properly processing ICL-repair intermediates. p.Leu230Pro XPF is more similar to the products of previously described *ERCC4* mutations in that it is less stable and might have a tendency to aggregate in the cytoplasm. However, sufficient amounts of the protein are properly folded and reach chromatin, where it appears to have some activity in the removal of 6-4 PPs. Residual NER activity in the skin tissue of individual 1333 in vivo might explain why this individual has no clinically relevant skin photosensitivity,

although we cannot exclude that dermatological problems will arise later in life. A final category of *ERCC4* mutations is associated with XFE progeroid syndrome, which is characterized by very low levels of nuclear XPF, apparently insufficient to support either NER or ICL repair. Importantly, the only XFE-affected individual described suffered from both skin photosensitivity and anemia^{9,16} and shared some cellular features with XP (NER defect and UV-light sensitivity) and FA (extreme ICL sensitivity, DEB-induced chromosome fragility, and MMC-induced cell-cycle arrest), suggesting that XFE syndrome is characterized by a combination of XP and FA manifestations (Table S2). Exhaustion of hematopoietic stem cells is also an attribute of *ERCC1-XPF* hypomorphic mice that mimic XFE (Laura Niedernhofer, personal communication). Microsomy, microcephaly, and liver fibrosis were likewise observed in FA individual 1333, in *Ercc1*- and *Ercc4*-deficient mice, and in the unique *ERCC1*-deficient individual, who all lack ICL-repair functions.^{17–21}

In a broader sense, this study demonstrates that depending on the type of *ERCC4* mutation and the balance between NER and ICL-repair activities, affected individuals present with one of three clinically distinct disorders. This resembles the case of *XPD*, which is involved in XP complementation group D, trichothiodystrophy (MIM 601675), or Cockayne syndrome (MIM 216400) depending on the type of mutation,²² and highlights the value of characterizing rare genetic disorders for gaining insight into the mechanisms of genome maintenance and human disease. XPF has a central role in preventing genome instability, cancer, BMF, developmental abnormalities, and premature aging. Like those of other breast and ovarian cancer susceptibility genes mutated in FA,^{23,24} the product of *ERCC4* also acts downstream of *FANCD2* monoubiquitination. Therefore, it is important to study *FANCD2* as a candidate gene in hereditary breast and ovarian cancer.

Supplemental Data

Supplemental Data include three figures and two tables and can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG>.

Acknowledgments

The use of *FANCD2* as an alias for *ERCC4* was approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee. We would like to thank the families affected by Fanconi anemia and their clinicians for providing samples and clinical data, as well as María A. Blasco (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid) for providing *Ercc4*-deficient mouse embryonic fibroblasts. The J.A.B. laboratory is funded by grants from European Program “7FWP, Health” (PERSIST; agreement 222878), the Spanish Ministry of Science and Innovation (Refs110-90.1 and SAF 2009-07164), Programa RETICS-RD06/0010/0015 ISCIII, and Fundación Botín. O.D.S. acknowledges funding from the National Institutes of Health (GM080454 and CA092584). C.S. is funded by CCA/V-ICI Amsterdam. D.S. and B.S. received grants from the Deutsche Fanconi-Anaemie-Hilfe, Aktionskreis Fanconi-Anaemie, and the Schroeder-Kurth Fund. J.S.’s laboratory is funded by the

Generalitat de Catalunya (SGR0489-2009), the ICREA-Academia award, the Spanish Ministry of Science and Innovation (Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases [CIBERER] CB06/07/0023, SAF2009-11936, and SAF2012-31881), and the European Regional Development FEDER Funds. CIBERER is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Spain.

Received: November 13, 2012

Revised: March 5, 2013

Accepted: April 5, 2013

Published: April 25, 2013

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org>

RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>

References

1. Stoepker, C., Hain, K., Schuster, B., Hilhorst-Hofstee, Y., Rooimans, M.A., Steltenpool, J., Oostra, A.B., Eirich, K., Korthof, E.T., Nieuwint, A.W., et al. (2011). SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nat. Genet.* 43, 138–141.
2. Kim, Y., Lach, F.P., Desetty, R., Hanenberg, H., Auerbach, A.D., and Smogorzewska, A. (2011). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* 43, 142–146.
3. Antonio Casado, J., Callén, E., Jacome, A., Río, P., Castella, M., Lobitz, S., Ferro, T., Muñoz, A., Sevilla, J., Cantalejo, A., et al. (2007). A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J. Med. Genet.* 44, 241–249.
4. Deans, A.J., and West, S.C. (2009). FANCD2 connects the genome instability disorders Bloom’s Syndrome and Fanconi Anemia. *Mol. Cell* 36, 943–953.
5. Enzlin, J.H., and Schärer, O.D. (2002). The active site of the DNA repair endonuclease XPF-ERCC1 forms a highly conserved nuclease motif. *EMBO J.* 21, 2045–2053.
6. Almaraz, E., Río, P., Meza, N.W., Aldea, M., Agirre, X., Guenechea, G., Segovia, J.C., and Bueren, J.A. (2007). Characteristics of lentiviral vectors harboring the proximal promoter of the vav proto-oncogene: a weak and efficient promoter for gene therapy. *Mol. Ther.* 15, 1487–1494.
7. de Laat, W.L., Sijbers, A.M., Odijk, H., Jaspers, N.G., and Hoeijmakers, J.H. (1998). Mapping of interaction domains between human repair proteins ERCC1 and XPF. *Nucleic Acids Res.* 26, 4146–4152.
8. Sijbers, A.M., de Laat, W.L., Ariza, R.R., Biggerstaff, M., Wei, Y.F., Moggs, J.G., Carter, K.C., Shell, B.K., Evans, E., de Jong, M.C., et al. (1996). Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell* 86, 811–822.
9. Niedernhofer, L.J., Garinis, G.A., Raams, A., Lalai, A.S., Robinson, A.R., Appeldoorn, E., Odijk, H., Oostendorp, R., Ahmad, A., van Leeuwen, W., et al. (2006). A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotrophic axis. *Nature* 444, 1038–1043.
10. Trujillo, J.P., Mina, L.B., Pujol, R., Bogliolo, M., Andrieux, J., Holder, M., Schuster, B., Schindler, D., and Surrallés, J.

- (2012). On the role of FAN1 in Fanconi anemia. *Blood* 120, 86–89.
11. Ahmad, A., Enzlin, J.H., Bhagwat, N.R., Wijgers, N., Raams, A., Appeldoorn, E., Theil, A.F., J Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W., Jaspers, N.G., et al. (2010). Mislocalization of XPF-ERCC1 nuclease contributes to reduced DNA repair in XP-F patients. *PLoS Genet.* 6, e1000871.
 12. Limsirichaikul, S., Niimi, A., Fawcett, H., Lehmann, A., Yamashita, S., and Ogi, T. (2009). A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU). *Nucleic Acids Res.* 37, e31.
 13. Crossan, G.P., van der Weyden, L., Rosado, I.V., Langevin, F., Gaillard, P.H., McIntyre, R.E., Gallagher, F., Kettunen, M.I., Lewis, D.Y., Brindle, K., et al.; Sanger Mouse Genetics Project. (2011). Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. *Nat. Genet.* 43, 147–152.
 14. Knipscheer, P., Räsche, M., Smogorzewska, A., Enoiu, M., Ho, T.V., Schärer, O.D., Elledge, S.J., and Walter, J.C. (2009). The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* 326, 1698–1701.
 15. Moggs, J.G., Yarema, K.J., Essigmann, J.M., and Wood, R.D. (1996). Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. *J. Biol. Chem.* 271, 7177–7186.
 16. Gregg, S.Q., Robinson, A.R., and Niedernhofer, L.J. (2011). Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease. *DNA Repair (Amst.)* 10, 781–791.
 17. Weeda, G., Donker, I., de Wit, J., Morreau, H., Janssens, R., Vissers, C.J., Nigg, A., van Steeg, H., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H. (1997). Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Curr. Biol.* 7, 427–439.
 18. McWhir, J., Selfridge, J., Harrison, D.J., Squires, S., and Melton, D.W. (1993). Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nat. Genet.* 5, 217–224.
 19. Tian, M., Shinkura, R., Shinkura, N., and Alt, F.W. (2004). Growth retardation, early death, and DNA repair defects in mice deficient for the nucleotide excision repair enzyme XPF. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1200–1205.
 20. Jaspers, N.G., Raams, A., Silengo, M.C., Wijgers, N., Niedernhofer, L.J., Robinson, A.R., Giglia-Mari, G., Hoogstraten, D., Kleijer, W.J., Hoeijmakers, J.H., and Vermeulen, W. (2007). First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 457–466.
 21. Gregg, S.Q., Gutiérrez, V., Robinson, A.R., Woodell, T., Nakao, A., Ross, M.A., Michalopoulos, G.K., Rigatti, L., Rothmel, C.E., Kamileri, I., et al. (2012). A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology* 55, 609–621.
 22. Cleaver, J.E., Lam, E.T., and Revet, I. (2009). Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat. Rev. Genet.* 10, 756–768.
 23. Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., Freund, M., Lichtner, P., Hartmann, L., Schaal, H., et al. (2010). Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat. Genet.* 42, 410–414.
 24. Levy-Lahad, E. (2010). Fanconi anemia and breast cancer susceptibility meet again. *Nat. Genet.* 42, 368–369.

Efficient Generation of Disease-free Hematopoietic Progenitors from Fanconi Anemia Patients by Coupling Gene-Targeting and Somatic Cell Reprogramming

RUNNING TITLE: Targeted integration and reprogramming in Fanconi anemia

R.Baños^{1,*}, P.Río^{1,*}, A.Lombardo^{2,*}, O.Quintana¹, Z.Garate¹, L.Alvarez¹, P.Genovese², E.Almarza¹, S.Navarro¹, A.Valeri¹, Y.Torres³, J.P.Trujillo⁴, R.Murillas⁵, J.C.Segovia¹, E.Samper³, J. Surralles⁴, P.D.Gregory⁶, M.C.Holmes⁶, L.Naldini^{2,7,¶}, J.A.Bueren^{1,¶}

¹Division of Hematopoietic Innovative Therapies. CIEMAT/CIBERER, Madrid Spain.

²San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

³NIMGenetics SL, Madrid, Spain

⁴Universidad Autónoma Barcelona/CIBERER, Barcelona, Spain

⁵Division of Epithelial Biomedicine. CIEMAT/CIBERER, Madrid Spain.

⁶Sangamo BioSciences Inc., Richmond, CA, USA

⁷Vita Salute San Raffaele University, Milan, Italy

*These authors contributed equally to this work.

¶Correspondence to:

Juan A. Bueren, Email: juan.bueren@ciemat.es

Address: Avda.complutense 40.28040, Madrid Spain.

Phone: +34913466518. Fax: +34913466484.

for FA gene therapy

and to Luigi Naldini: Email naldini.luigi@hsr.it, for gene targeting technology

Abstract:

Homology Directed DNA Repair-based gene therapy is becoming a valid alternative to conventional gene transfer. It is unknown, however, whether this new approach will be suitable for the correction of genetic aplasias with defects in DNA repair, like Fanconi anemia (FA). Since FA can be caused by mutations in 16 different genes, we aimed to develop a gene-targeting platform widely applicable to FA. Because of the low number of hematopoietic stem cells in FA patients, we targeted *FANCA* gene into the *AAVS1* safe harbor locus of FA-A fibroblasts, using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vectors as HDR donors. Strikingly, the proliferative advantage of genetically corrected FA cells yielded up to 40% targeted cells in culture. We then subjected the targeted gene-edited(ge)FA-A fibroblasts to cell reprogramming and confirmed that all tested geFA-iPSC clones contained specific integration of *FANCA* in the *AAVS1* locus. Moreover, hematopoietic differentiation of these iPSCs efficiently generated disease-free hematopoietic progenitors. Our results demonstrate the efficacy of gene-targeting and cell reprogramming to generate disease-free hematopoietic progenitor cells from non-hematopoietic tissues of FA patients

INTRODUCTION

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease associated with congenital abnormalities, Bone Marrow (BM) failure and cancer predisposition (Shimamura & Alter, 2010). Although Hematopoietic Stem Cell (HSC) transplantation is currently the best therapeutic option to restore the hematopoietic function of these patients (MacMillan et al, 2011), HSC-based Gene Therapy (HGT) with autologous cells may represent a valid alternative for FA patients lacking a compatible BM donor (Tolar et al, 2011). In this respect, current HGT strategies with semi-randomly integrating Lentiviral Vectors (LV) are showing significant clinical benefits without severe adverse effects in several patients affected by a variety of monogenic diseases (Aiuti et al, 2013; Biffi et al, 2013; Cartier et al, 2009). Ideally, however, gene therapy should aim at targeting the therapeutic gene into a safe locus of the genome, thus potentially abrogating the risks associated with vector insertion in undesired genomic regions.

Depending on the genetic etiology of the disease, Homology directed repair (HDR)-mediated gene targeting approaches may be used either for direct substitution of the mutant sequence with the homologous functional DNA sequence or for insertion of the therapeutic transgene into pre-determined safe loci of the genome, often referred to as “safe harbors” (Naldini, 2011). FA is a complex disease where mutations in sixteen different genes (*FANCA*-A, -B, -C, -D1/*BRCA2*, -D2, -E, -F, -G, -I, -J/*BRIP1*, -L -M, -N/*PALB2*, -O/*RAD51C*; -P/*SLX4*; -Q/*ERCC4/XPF*) have been reported (Bogliolo et al, 2013; Kee & D'Andrea, 2010). Among all these genes, mutations in *FANCA* account for about 60% of total FA patients (Auerbach, 2009). While a few recurrent mutations (i.e. truncation of exon 4 in Spanish Gypsies or mutations in exons 13, 36 and 38) have been observed in FA-A patients, *FANCA* mutations are generally private mutations, which include point mutations, microinsertions, microdeletions, splicing mutations and large intragenic deletions (Castella et al, 2011). Thus, considering the large number of genes and mutations that can account for the FA disease, insertion of a functional FA gene in a “safe harbor” locus would facilitate the development of an Homology directed repair

(HDR)-mediated gene addition platform with broad therapeutic application to FA patients, regardless of their complementation group and mutation type.

Recent studies by us and others aiming to identify “safe harbors” in the human genome have shown robust and stable expression of transgenes integrated in the human *PPP1R12C* gene, a locus also known as *AAVS1*, across different cell types (Lombardo et al, 2011; Smith et al, 2008). Additionally, no detectable transcriptional perturbation of the *PPP1R12C* and its flanking genes were observed after integration of transgenes in this locus, indicating that *AAVS1* may represent a safe landing path for therapeutic transgene insertion in the human genome (Lombardo et al, 2011). These observations, together with the development of artificial Zinc Finger Nucleases (ZFNs) that efficiently and selectively target the *AAVS1* locus, have made possible gene editing strategies aiming at inserting therapeutic transgenes in this locus, not only in immortalized cell lines but also in several primary human cell types, including induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs) (Chang & Bouhassira, 2012; DeKolver et al, 2010; Garcon et al, 2013; Hockemeyer et al, 2009; Lombardo et al, 2011; Zou et al, 2011b).

Because HSCs constitute a very rare population in the BM of FA patients and are also highly sensitive to *ex vivo* manipulation (Li et al, 2005), and given that there are no available protocols for gene targeting in HSCs, we pursued the specific insertion of the therapeutic *FANCA* gene in the *AAVS1* locus of FA-A fibroblasts. From these gene edited cells, we then generated self-renewing disease-free iPSCs, which were subsequently differentiated towards the hematopoietic lineage upon optimization of previously described differentiation protocols (Raya et al, 2009).

Our goal appeared particularly challenging, taking into account that FA is a DNA repair syndrome (Kim & D'Andrea, 2012; Nakanishi et al, 2005; Yang et al, 2005), which may thus limit HDR, and also that reprogramming of FA cells is particularly inefficient, unless these cells have been previously subjected to gene complementation (Muller et al, 2012; Raya et al, 2009). In spite of these hurdles, the strong selective growth advantage associated with correction of the FA phenotype, allowed establishing a new approach for the efficient generation of FA

HPCs harboring specific integrations of the therapeutic *FANCA* gene in a safe harbor locus.

RESULTS

Efficient gene targeting-mediated complementation of fibroblasts from FA-A patients.

To promote insertion of a *FANCA* expression cassette into the *AAVS1* locus, an Integrase-Defective Lentiviral Vector (IDLV) harboring *EGFP* and the *FANCA* transgenes flanked by homology arms to the *AAVS1* locus (donor IDLV) was generated (Fig.1A top schematic). In this donor IDLV, *FANCA* is under the transcriptional control of the human PGK promoter. In addition, a promoterless *EGFP* cDNA preceded by a Splice Acceptor (SA) site and a translational self-cleaving 2A sequence was also included upstream of the *FANCA* cassette. Upon HDR-mediated insertion into *AAVS1*, the *EGFP* cassette is placed under the transcriptional control of the promoter of the ubiquitously expressed *PPP1R12C* gene, thus allowing selection of the cells with targeted integration by FACSorting (Figure 1A). Beside the donor IDLV, an adenoviral vector expressing a ZFN pair (AdV5/35-ZFN), designed to induce a DNA double stand break in the *AAVS1* locus, was used to enhance the efficiency of HDR-mediated integration in this locus (Hockemeyer et al, 2009).

To investigate the feasibility of performing gene targeting in FA-A cells, which have been reported to have milder defects in HDR as compared to other FA genes like *BRCA2/FANCD1* (Kim & D'Andrea, 2012; Nakanishi et al, 2005), skin fibroblasts from four FA-A patients with different mutations in *FANCA* were transduced either with the donor IDLV alone, or with the donor IDLV and the AdV5/35-ZFNs simultaneously. Fourteen days after transduction, the cells were analyzed by flow cytometry to measure the proportion of EGFP⁺ fibroblasts. While less than 0.05% of the cells transduced with the donor IDLV alone were positive for EGFP, from 0.2% to 1.1% of the FA fibroblasts that had been co-transduced with the donor IDLV and the ZFNs-AdV were EGFP⁺ (Figure 1B). Strikingly, the percentage of EGFP⁺ cells markedly increased during the *in vitro* culture of these cells, reaching

levels between 5.5-13.4% (Figure 1C), showing a proliferation advantage of the gene edited FA-A fibroblasts.

Because the prolonged *in vitro* culture of FA fibroblasts frequently results in increased rates of cell senescence (Muller et al, 2012), in a new set of experiments we transduced fibroblasts from three FA patients (FA-52, FA-123 and FA-644) with an excisable *hTERT*-expressing LV (Salmon et al, 2000) prior to perform the gene-targeting procedure. As shown in Figure 1D, the proportion of EGFP⁺ cells determined fourteen days after gene targeting was markedly increased (3-4 fold) in *hTERT*-transduced *versus* untransduced FA fibroblasts. In agreement with the experiments performed with non-immortalized fibroblasts, when immortalized gene-edited FA fibroblasts were maintained in culture, a progressive increase in the proportion of EGFP⁺ cells was also observed. As shown in Figure 1E, ~40% of the FA-52 fibroblasts subjected to immortalization and targeted genome editing (geFA-52T) were EGFP⁺ after 42 days in culture. Insertion of the *EGFP/FANCA* cassette into the *AAVS1* locus of sorted EGFP⁺ geFA-52T fibroblasts was confirmed by PCR, using two pairs of primers that amplify, respectively, the 5' or the 3' integration junctions between the *EGFP/FANCA* cassette and the endogenous *AAVS1* locus (Figure 1F).

To investigate whether insertion of the therapeutic *hFANCA* cassette in the *AAVS1* locus of FA-A fibroblasts could result in phenotypic correction of the disease, the functionality of the FA pathway in FA-52T fibroblasts was tested both before and after the gene targeting procedure. As a positive control, healthy donor fibroblasts (HD) were analyzed in parallel. The presence of nuclear FANCD2 foci, which is fully dependent on the expression of all the FA core complex proteins, including FANCA (Garcia-Higuera et al, 2001), was determined in these samples after DNA damage induced by mitomycin C (MMC). In contrast to uncorrected FA-52T fibroblasts, which did not generate FANCD2 foci even after MMC exposure, a significant proportion of the geFA-52T fibroblasts generated FANCD2 foci, mainly after treatment with MMC, thus mimicking the response of HD (Healthy Donor) fibroblasts (Figure 2A).

Because the main characteristic of FA cells is the increased chromosomal instability upon exposure to DNA inter-strand cross-linking (ICL) drugs, we also investigated the response of both uncorrected and gene-edited FA-A fibroblasts to diepoxibutane (DEB). As shown in Figure 2B, in the absence of DEB, basal levels of chromosomal aberrations (<5 aberrations in total per 20 metaphases analyzed) were observed in these cells, suggesting that gene targeting procedure did not generate genetic instability in these cells. Moreover, while DEB induced a high number of chromosomal aberrations -which included chromatidic breaks and the FA characteristic radial chromosomes- in FA-52T fibroblasts, only a reduced number of chromosomal aberrations was induced by DEB in these cells after gene-targeting.

Taken together, these results show the feasibility of correcting the phenotype of FA cells using HDR strategies, in particular by promoting the insertion and expression of *FANCA* in the *AAVS1* safe harbor locus of fibroblasts from FA-A patients.

Efficient generation of disease free iPSCs from FA fibroblasts corrected by gene targeting.

To generate disease-free FA iPSCs, FA fibroblasts subjected to gene editing (geFA-123, geFA-52 and geFA-52T) were enriched for EGFP⁺ cells by cell sorting and then reprogrammed using a polycistronic excisable LV expressing the human *SOX2*, *OCT4*, *KLF4* and *cMYC* transgenes from the *EF1A* promoter (STEMCCA vector)(Somers et al, 2010). After two weeks in culture, characteristic ES-like colonies emerged from reprogrammed geFA-123 and geFA-52T fibroblasts, while no colonies were generated from geFA-52 cells. Colonies generated from geFA-123 cells progressively disappeared after five passages, while 80% of the geFA-52T colonies picked after 2 weeks could be expanded for at least 5 passages (Suppl. Figure 1), indicating the relevance of the ectopic expression of *hTERT* to facilitate the reprogramming of disease-free FA-A fibroblasts complemented by gene editing.

Twelve out of the 60 iPSC clones generated from geFA-52T cells were further expanded and differentiated into fibroblasts to perform additional molecular

studies. First, qPCR analyses were conducted to determine the mean copy number per cell of the *EGFP/FANCA* cassette. As shown in Supplementary Table I, 11 out of the 12 geFA-iPSC clones analyzed were positive for *EGFP* integration and contained an average of 0.98 ± 0.44 EGFP copies per cell. The only iPSC clone that did not harbor any EGFP copy (clone 5) did not progress more than six passages in culture.

To investigate whether the *EGFP/FANCA* cassette was specifically integrated in the *AAVS1* locus of all these iPSC clones, 3' primers previously used in analyses of Figure 1F were used. As shown in Supplementary Table I, all the iPSC clones that were positive for integration of the cassette were also positive for the PCR band corresponding to the specific insertion in the *AAVS1* locus.

Three geFA-iPSC clones (clones 16, 26 and 31) were selected for further characterization. First, the pluripotency of these gene corrected clones was analyzed both by alkaline phosphatase (AP) staining and immunohistochemistry staining of different pluripotency genes. Representative pictures in Figure 3A show that all tested geFA-iPSCs clones were highly positive for expression of AP, NANOG, TRA-1-60, OCT4 and SSEA-4. RT-qPCR analysis for expression of the endogenous pluripotency genes *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC* and *REX1* was consistent with the pluripotent nature of these clones, being the levels of expression of these genes very similar to those measured in human ES cells (Figure 3B). In all cases, a very low expression of the ectopic reprogramming transgenes was found, indicating substantial inactivation of the *EF1A* promoter present in the reprogramming vectors.

To further demonstrate the pluripotency of the geFA-iPSCs, geFA-iPSC16 cells were subcutaneously inoculated in NSG mice, to test the ability of these cells to generate teratomas. As shown in Figure 3C, characteristic teratomas containing complex structures representing the three embryonic germ layers were observed 8-10 weeks after implantation. The hematoxylin and eosin staining of the teratomas' sections showed cutaneous cell mucosous epithelium, including goblet cells, bone and pancreatic acinar cells with excretory tubule; structures representatives of the ectoderm, endoderm and mesoderm tissue.

Immunofluorescence stainings also confirmed expression of definitive endoderm markers (Fox2A), neural structures that expressed neuroectodermal markers (β -III Tubulin), and the generation of mesoderm (Brachyury) and mesoderm derivatives tissue such as muscle (α -SMA). As expected for *bona fide* iPSC clones, *OCT4* and *NANOG* promoters were hypomethylated in gene-corrected FA iPSC clones, in clear contrast to the high level of methylation observed in HD fibroblasts (Figure 3D).

Finally, Southern blot analyses performed on genomic DNA extracted from the gene-edited geFA-iPSC clones 16, 26 and 31 confirmed mono-allelic integration of the *EGFP/FANCA* cassette into the *AAVS1* locus of each clone (Figure 3E and F). These results confirm specific integration of the FANCA-cassette into the *AAVS1* locus in the gene-corrected FA-iPSC clones.

Once demonstrated the generation of *bona fide* gene-edited FA iPSCs, in the next set of experiments we aimed to verify whether these geFA-iPSCs were disease-free, as we previously shown for their parental gene-edited FA fibroblasts (Figures 2A and 2B). First, we checked by qRT-PCR the level of expression of hFANCA in these geFA-iPSCs. Notably, levels of hFANCA mRNA expression obtained in the three tested geFA-iPSC clones were very similar to levels observed in the control ES cell line, and markedly higher when compared to uncorrected FA-52T fibroblasts (Figure 4A). This observation was confirmed by Western blot analyses of FANCA (Figure 4B), and also by the observation of nuclear FANCD2 foci in geFA iPSC clones exposed to MMC (Figure 4C).

Cytogenetic analysis of geFA-iPSC clones 16, 26 and 31 showed a normal karyotype in clones 16 and 31, while clone 26 showed a trisomy in the Y-chromosome. One of these clones, clone 16, was also challenged with DEB and, as happened with its parental gene-edited fibroblasts, basal levels of chromosomal aberrations were observed in these cells, consistent with a functional FA pathway in these cells (Figure 4D).

To discard the possibility that the FA pathway in these iPSCs was restored due to the spontaneous reversion of either mutated *FANCA* alleles, the persistence of the original pathogenic mutations described in this patient (c.710-5T>C and

c.3558insG) were confirmed by Sanger sequencing performed on both FA-52T fibroblasts and the geFA-iPSCs clones 16, 26 and 31 (Suppl. Figure 2). This data confirms that the functional FA pathway, and thus the disease-free nature of gene edited FA-iPSCs, is a consequence of the expression of the therapeutic FANCA targeted within the *AAVS1* safe harbor site of the parental FA-fibroblasts.

Aiming to excise the STEMCCA vector from the genome of the gene-edited FA-iPSCs, clone 16 was transduced with an IDLV co-expressing the Cre recombinase and the Cherry fluorescence marker (Papapetrou & Sadelain, 2011), and individual colonies were isolated. RT-qPCR analysis performed on one of the excised clones (geFA-iPSC clone 16Ex) showed the expression of endogenous pluripotency genes (*SOX2*, *OCT4*, *KLF4*, *NANOG*, *cMYC* and *REX1*; Figure 5A) and background signal for the ectopic transgenes. Additionally, this clone generated teratomas with structures characteristics of the three germ layers (Figure 5B) and harbored hypomethylated *NANOG* and *OCT4* promoters (Figure 5C). This vector-free iPSC clone remained with a normal karyotype and with basal numbers of chromosomal aberrations after exposure to DEB, showing the disease-free nature of these geFA-iPSCs (Supplem. Figure 3).

Generation of disease-free hematopoietic progenitors from gene-edited FA-A iPSCs.

In a final set of experiments we investigated whether gene-edited FA-A iPSCs were capable of generating hematopoietic progenitor cells free of the characteristic disease phenotype. To conduct these experiments, embryoid bodies from geFA - iPSC clones 16 and 16Ex were first generated (Feng et al, 2010). Thereafter, hematopoietic differentiation was induced by exposure to hematopoietic cytokines (see materials and methods).

As shown in Figure 6, the generation of hematopoietic progenitors after 21 days in culture was first demonstrated by the presence of early hematopoietic precursors double positive for the CD34 and CD43 markers, the more committed CD34⁺/CD45⁺ hematopoietic progenitors (see flow cytometry in Figure 6A), and also by the total number of CD45⁺ cells. An improved hematopoietic differentiation

potential was observed for the iPSCs in which the reprogramming cassette was excised by the Cre-IDLV. In this case, 12% or 6% of the analyzed cells were CD45⁺ or CD34⁺/CD45⁺, respectively (Figure 6A and B). Consistent with the flow cytometry data, well differentiated myeloid and erythroid colonies were generated 14 days after the *in vitro* culture of geFA iPSC-differentiated cells in methylcellulose (Figure 6C and 6D). As it was observed in the flow cytometry studies, a two fold increase in the number of hematopoietic progenitors was observed in geFA-IPSCs clone 16Ex compared to its parental geFA-IPSCs cells.

In a final set of experiments we investigated whether the characteristic MMC hypersensitivity of FA cells was corrected in FA hematopoietic progenitors derived from gene edited reprogrammed FA-fibroblasts. As shown in Figure 6E, geFA-IPSC-derived hematopoietic progenitors were almost as resistant to MMC as healthy cord blood progenitor cells, and were markedly more resistant to MMC compared to hematopoietic progenitors from two different FA patients.

DISCUSSION

Thanks to the development of artificial nucleases capable of generating DNA Double Strand Breaks (DSBs) in pre-determined sequences of the genome (Cong et al, 2013; Joung & Sander, 2013; Mali et al, 2013; Porteus & Baltimore, 2003; Urnov et al, 2010) the possibility of developing HDR-mediated gene therapy is getting closer to its clinical application. Whether these approaches will be amenable for the treatment of DNA repair syndromes like FA is however uncertain, both because of the limited HSCs content in FA patients, and also because of the impact that DNA repair defects of FA cells may have on the efficacy of HDR (Nakanishi et al, 2005).

To answer to this question, we first investigated the possibility of developing a gene editing platform applicable to most FA complementation groups and gene mutations through the specific insertion of the therapeutic FA gene – *FANCA* in this study - in a safe harbor locus of the human genome - the *AAVS1* locus (Lombardo et al, 2011). To overcome the difficulties of performing gene editing in HSCs, and in particular those derived from FA patients, which represents a very rare

population highly sensitive to *in vitro* manipulation, we performed the gene targeting procedure on skin FA-A fibroblasts, which were subsequently reprogrammed to pluripotency and then differentiated into disease-free hematopoietic progenitors, a similar strategy that we previously undertook for FA fibroblasts but using conventional gene transfer approaches (Raya et al, 2009). While the generation of HDR-mediated disease-free FA iPSCs could be approached first through the generation of uncorrected FA iPSCs, thereafter subjected to gene editing, several studies have already shown that reprogramming of FA cells is highly inefficient and results in cells with multiple genetic abnormalities (Muller et al, 2012; Raya et al, 2009; Yung et al, 2012). Thus, we opted to perform first the gene editing-mediated complementation in FA fibroblasts, and then to reprogram these cells to finally generate disease-free hematopoietic progenitors.

Our results demonstrate the feasibility of performing HDR-mediated insertion in FA-A cells with significant efficacies (up to 4%), comparable to those reported in primary cells competent for DNA repair (DeKolver et al, 2010; Lombardo et al, 2011; Sebastiano et al, 2011; Soldner et al, 2011; Zou et al, 2011a; Zou et al, 2011b). Our observation of efficient gene editing in FA fibroblasts confirm previous studies showing a limited impact of FANCA in HDR, as compared to other FA proteins like BRCA2 (Nakanishi et al, 2005). Nevertheless, we should also consider that the design of the donor IDLV used for transduction should drive some transient expression of FANCA from the unintegrated retrotranscribed vector before or concurrently to ZFN expression (Hockemeyer et al, 2009; Matrai et al, 2011), thus potentially enhancing the efficacy of HDR in these cells and providing the means for enabling HDR also in the more challenging FA genotypes. Although the specificity of gene targeting might be reduced in FA cells, the observation that eleven out of the twelve iPSC clones that were generated from gene-edited FA fibroblasts contained one single copy of *FANCA* specifically integrated in the target *PPPR12C* gene clearly demonstrates that this is not the case, at least in FA-A cells, and further corroborates the specificity of the *AAVS1* ZFNs used in this study (Hockemeyer et al, 2009; Lombardo et al, 2011).

Our results also show that in the absence of any artificial selection procedure, a progressive increase in the proportion of FA-fibroblasts corrected by targeted integration was observed along the *in vitro* expansion of these cells, which constituted up to 40% of the total population of FA fibroblasts after 42 days in culture. The growth advantage of gene-edited FA fibroblasts is consistent with previous observations showing the improved growth proliferation properties of FA precursor cells that either reverted a pathogenic FA gene mutation (Gregory et al, 2001; Gross et al, 2002; Waisfisz et al, 1999) or were gene-complemented with integrative vectors (Rio et al, 2008).

Our gene editing and cell reprogramming experiments with FA fibroblasts also show the relevance of transducing these cells with *hTERT*, probably because of the pro-senescence properties of FA-deficient cells (Muller et al, 2012). Significantly, the transduction of these cells with *hTERT*-LVs both increased the efficiency of gene editing, as well as of cell reprogramming. Previous studies have shown the improved efficacy of iPSC generation when cells were reprogrammed with vectors that include the SV40 large T antigen, either alone or combined with *hTERT* (Mali et al, 2008; Park et al, 2008). Our proof of concept experiments now demonstrate the advantages associated with ectopic expression of *hTERT* both in gene-editing and in cell reprogramming, at least when FA cells are considered.

The ability of gene-edited FA fibroblasts and iPSCs to generate nuclear FANCD2 foci demonstrated that FA pathway was restored. Similarly, the cytogenetic analysis of these samples evidenced the reversion of the chromosomal instability of FA cells to DEB, demonstrating that the specific targeting of the donor *FANCA* construct in the *AAVS1* locus has completely corrected the phenotype of FA-A fibroblasts and iPSCs. In the absence of DEB, a normal karyotype was observed in gene-edited FA fibroblasts and in two out of the three iPSC clones that were generated, showing the feasibility of generating cells without inducing evident karyotype abnormalities after the gene-editing and cell reprogramming approaches used for the generation of disease-free FA iPSCs.

Consistently with our previous study showing the generation of disease-free FA iPSCs through conventional gene therapy approaches (Raya et al, 2009) our new

study shows the efficient hematopoietic differentiation of gene edited FA iPSCs. Moreover in the current study we observed the generation of increased numbers of hematopoietic progenitors from iPSCs subjected to excision of the reprogramming cassette, confirming previous observations indicating that the expression of reprogramming genes limits the iPSC differentiation potential (Ramos-Mejia et al, 2012). The improved hematopoietic differentiation observed in these experiments and the robust expression of the therapeutic *FANCA* gene targeted into the safe harbor *AAVS1* locus should account for the generation of a high number of hematopoietic progenitors showing a normalized response to MMC.

Taken together, our study demonstrates the possibility of conducting an efficient and precise HDR-based gene therapy approach in FA cells. Moreover, we show the feasibility of reprogramming these cells to generate iPSC-derived gene edited hematopoietic progenitors characterized by a disease-free phenotype. Our approach constitutes a new proof-of-concept with a potential future clinical impact to optimize the generation of gene corrected HSCs from non-hematopoietic tissues of patients with aplasias of genetic etiology. Moreover, safe harbor directed transgenes may provide a safer strategy for the gene therapy of a broader set of human diseases.

METHODS

Cell lines and primary fibroblasts.

293T and HT1080 cells (ATCC: CRL-11268 y ATCC: CCL-121) were used for the production and titration of the LVs, respectively. Cells were grown in Dulbecco's modified medium GlutaMAXTM (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Biowhitaker) and 0.5% penicillin/streptomycin solution (Gibco). Skin fibroblasts were obtained from FA-5, FA-123, FA-664 and FA-52 patients and were maintained in DMEM (Invitrogen) supplemented with 20% FBS (Biowhitaker) and 1% penicillin/streptomycin solution (Gibco) at 37°C under hypoxic conditions (5% of O₂ and 5% of CO₂). Patients were classified as FA-A patients as previously described (Casado et al, 2007) after the informed consent was signed. The ES4 and H9 (NIH Human Embryonic Stem Cell Registry,

<http://stemcells.nih.gov/research/registry/>) lines of hES cells were maintained as originally described (Raya et al, 2008).

Vectors.

pCCL.sin.cPPT.AAVS1.loxP.SA.2A.GFP.pA.loxP.PGK.FANCA.pA.Wpre donor transfer LV (donor IDLV) was generated using elements from the backbones pCCL.PGK.FANCA.Wpre* (Gonzalez-Murillo et al, 2010) and pCCLsin.cPPT.AAVS1.2A.GFP.pA (Lombardo et al, 2011). The integrase-defective third-generation packaging plasmid pMD.Lg/pRRE.D64Vint was used to produce IDLV particles (Lombardo et al, 2007). pLM.CMV.Cherry.2A.Cre (Papapetrou et al, 2011) and pLox.TERT.ires.TK (Salmon et al, 2000) vectors were provided by Addgene. For reprogramming experiments the EF1A STEMCCA lentiviral vector -kindly provided by Dr. Mostoslavsky (Sommer et al, 2009)- was used. This vector contains the cDNAs for OCT4, SOX2, c-MYC and KLF4 flanked by loxP sequences for their subsequent excision. ZFNs targeting intron 1 of the *PPP1R12C* gene were expressed from an Adenoviral Vector (AdV5/35) under the control of the CMV promoter (Lombardo et al, 2011).

Cell transduction.

For gene editing experiments, fibroblasts from FA-A patients were transduced either with donor IDLV alone (150 ng HIV Gag p24 ml⁻¹) or together with AdV5/35-ZFNs (Multiplicity of infection (MOI) 200). Fourteen days post-transduction the proportion of EGFP⁺ cells was determined by flow cytometry (BD LSRFortessa cell analyzer, Becton Dickinson Pharminger). To immortalize fibroblasts from FA-52 and FA-123 patients, 10⁵ cells were transduced at MOI 1 with the pLox.TERT.ires.TK LV (Salmon et al, 2000) for 24 hours. To excise the reprogramming cassette and hTERT from established hiPSCs, single cell suspensions were generated by incubation with acutase (Gibco) and transduced for 10 hours with the IDLV pLM.CMV.Cherry.2A.Cre. Immediately after transduction, 2x10⁴ cells/ 10 cm² dish, expressing Cherry protein were sorted and new subclones of the parental geFA-IPSCs were generated.

Hematopoietic differentiation.

iPSC colonies were detached using collagenase type IV (Gibco) for 30 min at 37°C washed and centrifuged at 200xg, resuspended in differentiation media composed by KO-DMEM (Gibco) supplemented with 20% non-heat inactivated FBS (Biowhitaker), 1% NEAA (Lonza, Biowhitaker), L-Glu (1mM; Invitrogen), β -mercaptoethanol (0.1mM; Gibco) and hrBMP4 (0.5 ng/ml; Prepotech), and plated in ultra-low attachment plates (Costar). After 2 days, media was replaced by Stempro 34 (Invitrogen) supplemented with 0.5% Pen/Streptomycin, L-Glu (2mM; Invitrogen), MTG (40mM; Sigma), Ascorbic Acid (50 μ g/ml; Invitrogen), hrSCF, hrFlt3 ligand and TPO (100 ng/ml; EuroBioSciences), hrIL3 (10 ng/ml; Biosource), hrIL6 (10 ng/ml; Prepotech), hrBMP4 (50ng/ml; Prepotech), Wnt11(200 ng/ml; R&D) and rhVEGF(5 ng/ml; Prepotech). Media was changed every 3-4 days. At day 7 media was replaced by fresh media where rhWnt-11 was substituted by rhWnt-3a (200 ng/ml; R&D). Media was changed every 3-4 days. At day 14 and 21 immunophenotypic analysis of the differentiated cells was performed by flow cytometry and colony-forming unit assays were conducted (See Supplementary methods).

Flow cytometry.

Transduction with the Adv5/35-ZFNs and the donor IDLV, $1-5 \times 10^5$ viable cells were analyzed by flow cytometry analysis (FACSCalibur; Becton Dickinson Pharmingen).

Immunophenotypic analysis of the hematopoietic differentiated cells was performed using the following antibodies according to the manufacturer's instructions: phycoerythrin (PE)-Cy7 conjugated anti-human CD34 (BD Pharmingen), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD31 (eBiosciencies), allophycocyanin (APC)-conjugated anti-human CD45 (BD) and fluoresceine isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD43 (BD). Fluorochrome-matched isotypes were used as controls. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Roche)

positive cells were excluded from the analysis. Analysis was performed using FlowJo software.

Immunofluorescence and Western blots of Fanconi anemia proteins.

Analyses of FANCD2 foci were performed by immunofluorescence of primary fibroblasts or iPSCs treated for 16h with 200 nM of MMC. After MMC treatment, cells were stained with rabbit polyclonal anti-FANCD2 (Abcam, ab2187-50) as previously described (Hotta & Ellis, 2008; Raya et al, 2009). Cells with more than ten foci were scored as positive. FANCA expression was analyzed by Western blot (Raya et al, 2009) using the following antibodies: hFANCA (ab5063 Abcam) and anti-beta Actin to mouse antibody (ab6276, Abcam) as control. Goat polyclonal antibody to rabbit IgG (HRP) (ab6721-1, Abcam) and sheep polyclonal antibody to mouse IgG - H&L (HRP) (ab 6808, Abcam) were used as secondary antibodies. Protein quantification was done with Image J software.

FANCA expression by qRT-PCR.

The expression of human *FANCA* mRNA was analyzed in the different clones of geFA-iPSCs by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) (Gonzalez-Murillo et al, 2010) using primers described in Supplementary Methods. Parental fibroblasts from FA-52 and ES H9 were used as a control.

Gene targeting analysis: PCR and Southern blots.

For PCR analysis genomic DNA was extracted with DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). To detect the targeted integration of the HDR cassette in the *AAVS1* locus two different pair of primers for the the 3' or the 5' integration junction (5'TI and 3'TI respectively) were used (Supplementary methods table). PCR was conducted as follows: 2 min at 94°C, 40 cycles of 30 s at 94°C, 30s at 58°C (5'TI) and 59°C (3'TI), 1 min at 72°C and one final step for 5 min at 72°C. The proper target integration amplified a 1195 pb amplicon for the 5' TI and a 1314 pb fragment for the 3' TI that were resolved in agarose gel at 2%. For Southern blot

analyses, genomic DNA was extracted and digested either with *Bst*XI enzyme or with *Bgl*II (both from New England Biolabs). Matched DNA amounts were separated on 0.8% agarose gel, transferred to a nylon membrane (Hybond XL, GE Healthcare) and probed either with the ³²P-radiolabeled sequence of a fragment of EGFP to detect specific (5.1 kb) and non-specific integrations or with a probe of AAVS1 gene located outside of the homology arm (in the 3' region) to detect specific integration in the proper target locus (5.3 kb) and the unmodified AAVS1 locus (3.5 Kb). To detect the radiolabel signal, auto- radiographic films were used (Amershan Hyperfilm ECL, GE Healthcare) and they were exposed in an automatic reveal machine Curix60 (AGFA).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Prof. Juan C. Izpisua-Belmonte and Dr. Guillermo Guenechea for helpful discussions; Laura Cerrato for technical assistance with iPSCs and Aurora de la Cal for coordination with the Fanconi Anemia Network. We are also indebted to the FA patients, families and clinicians from the FA network. This work was supported by grants to J.A.B. from the European Union (FP7 GA 222878 PERSIST), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (International Cooperation on Stem Cell Research Plan E; Ref PLE 2009/0100; SAF 2009-07164 and SAF2012-39834), Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (RETICS-RD06/0010/0015 and RD12/0019/0023), Dirección General de Investigación de la Comunidad de Madrid (CellCAM; Ref S2010/BMD-2420) and La Fundació Privada La Marató de TV3, 121430/31/32; to L.N. from Telethon (TIGET grant D2), European Union (FP7 GA 222878 PERSIST, ERC Advanced Grant 249845 TARGETINGGENETHERAPY) and the Italian Ministry of Health. The authors also thank the Fundación Marcelino Botín for promoting translational research at the Hematopoietic Innovative Therapies Division of the CIEMAT.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

Contribution: RB*, PR*, AL*, LN, JAB: Conceived and designed the experiments. RB*, PR*, AL*, OQ, ZG, LA, EA, SN, AV, YT, JPT: Conducted experiments. JCS, ES, JS, PDG, MCH: Provided reagents, tools, ideas. PR*, RB*, AL*, LN, JAB: Wrote the paper.

DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

Declaration: P.D.G. and M.C.H. are current or former employees of Sangamo BioSciences, Inc. This manuscript does not represent conflict of interest for the rest of the authors.

THE PAPER EXPLAINED:

PROBLEM:

Homologous recombination (HR)-based gene therapy is becoming a true alternative to conventional hematopoietic stem cell gene therapy. It is however unknown whether these approaches would be applicable to genetic aplasias like Fanconi anemia (FA), characterized by a defective DNA repair machinery and by the presence of reduced HSCs numbers in patients' bone marrow. Additionally, the existence of 16 different FA genes, each of them with multiple mutations potentially accounting for the disease, would imply the necessity of developing individualized HR-strategies of gene therapy in FA patients.

RESULTS:

We have developed a gene-editing platform applicable to all FA subtypes and FA gene mutations based on the insertion of the therapeutic FA gene in a *safe harbor* locus. In particular, we have demonstrated an efficient and specific targeting of *FANCA* in the *AAVS1* safe harbor locus of FA-A patients' fibroblasts. Moreover, gene-edited FA-A fibroblasts were reprogrammed to generate disease-free iPSCs, and then re-differentiated towards the hematopoietic lineage in a process that resulted in the generation of gene-edited, disease-free, hematopoietic progenitor cells.

IMPACT

We have developed a gene editing and cell reprogramming platform applicable to all FA subtypes and FA gene mutations which efficiently generated gene-edited hematopoietic progenitor cells from skin fibroblasts. The generation of disease-free HSCs through the specific insertion of therapeutic transgenes in a safe harbor locus of non-hematopoietic cell tissues, followed by the reprogramming of these edited cells, will constitute an implemented approach to overcome HSC defects characteristic of genetic aplasias like FA.

REFERENCES:

- Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, Dionisio F, Calabria A, Giannelli S, Castiello MC et al (2013) Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in Patients with Wiskott-Aldrich Syndrome. *Science* Jul 11
- Auerbach AD (2009) Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* 668: 4-10
- Biffi A, Montini E, Lorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, Baldoli C, Martino S, Calabria A, Canale S et al (2013) Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Benefits Metachromatic Leukodystrophy. *Science* Jul 11
- Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, Derkunt B, Su Y, Raams A, Trujillo JP, Minguillon J, Ramirez MJ, Pujol R et al (2013) Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *American journal of human genetics* 92: 800-806
- Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, Vidaud M, Abel U, Dal-Cortivo L, Caccavelli L et al (2009) Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326: 818-823
- Casado JA, Callen E, Jacome A, Rio P, Castella M, Lobitz S, Ferro T, Munoz A, Sevilla J, Cantalejo A et al (2007) A comprehensive strategy for the subtyping of Fanconi Anemia patients: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia research network. *J Med Genet* 44: 241-249
- Castella M, Pujol R, Callen E, Trujillo JP, Casado JA, Gille H, Lach FP, Auerbach AD, Schindler D, Benitez J et al (2011) Origin, functional role and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. *Blood* 117: 3759-3769
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA et al (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823
- Chang CJ, Bouhassira EE (2012) Zinc-finger nuclease mediated correction of alpha-thalassemia in iPS cells. *Blood* 120: 3906-3914
- DeKolver RC, Choi VM, Moehle EA, Paschon DE, Hockemeyer D, Meijsing SH, Sancak Y, Cui X, Steine EJ, Miller JC et al (2010) Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res* 20: 1133-1142
- Feng Q, Lu SJ, Klimanskaya I, Gomes I, Kim D, Chung Y, Honig GR, Kim KS, Lanza R (2010) Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* 28: 704-712
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7: 249-262

Garcon L, Ge J, Manjunath SH, Mills JA, Apicella M, Parikh S, Sullivan LM, Podsakoff GM, Gadue P, French DL et al (2013) Ribosomal and hematopoietic defects in induced pluripotent stem cells derived from Diamond Blackfan anemia patients. *Blood* Jun 6

Gonzalez-Murillo A, Lozano ML, Alvarez L, Jacome A, Almarza E, Navarro S, Segovia JC, Hanenberg H, Guenechea G, Bueren JA et al (2010) Development of lentiviral vectors with optimized transcriptional activity for the gene therapy of patients with Fanconi anemia. *Hum Gene Ther* 21: 623-630

Gregory JJ, Jr., Wagner JE, Verlander PC, Levrant O, Batish SD, Eide CR, Steffenhagen A, Hirsch B, Auerbach AD (2001) Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2532-2537

Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H (2002) Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* 98: 126-135

Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKever RC, Katibah GE, Amora R, Boydston EA, Zeitler B et al (2009) Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 27: 851-857

Hotta A, Ellis J (2008) Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *Journal of cellular biochemistry* 105: 940-948

Joung JK, Sander JD (2013) TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 49-55

Kee Y, D'Andrea AD (2010) Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev* 24: 1680-1694

Kim H, D'Andrea AD (2012) Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev* 26: 1393-1408

Li X, Le Beau MM, Ciccone S, Yang FC, Freie B, Chen S, Yuan J, Hong P, Orazi A, Haneline LS et al (2005) Ex vivo culture of Fancc $-/-$ stem/progenitor cells predisposes cells to undergo apoptosis and surviving stem/progenitor cells display cytogenetic abnormalities and an increased risk of malignancy. *Blood* 105: 3465-3471

Lombardo A, Cesana D, Genovese P, Di Stefano B, Provasi E, Colombo DF, Neri M, Magnani Z, Cantore A, Lo Riso P et al (2011) Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. *Nat Methods* 8: 861-869

Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee YL, Kim KA, Ando D, Urnov FD, Galli C, Gregory PD et al (2007) Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 25: 1298-1306

MacMillan ML, Hughes MR, Agarwal S, Daley GQ (2011) Cellular therapy for fanconi anemia: the past, present, and future. *Biol Blood Marrow Transplant* 17: S109-114

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823-826

Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu X, Lin J, Chen G, Zou J, Cheng L (2008) Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* 26: 1998-2005

Matrai J, Cantore A, Bartholomae CC, Annoni A, Wang W, Acosta-Sanchez A, Samara-Kuko E, De Waele L, Ma L, Genovese P et al (2011) Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk. *Hepatology* 53: 1696-1707

Muller LU, Milsom MD, Harris CE, Vyas R, Brumme KM, Parmar K, Moreau LA, Schambach A, Park IH, London WB et al (2012) Overcoming Reprogramming Resistance of Fanconi Anemia Cells. *Blood* 119: 5449-5457

Nakanishi K, Yang YG, Pierce AJ, Taniguchi T, Digweed M, D'Andrea AD, Wang ZQ, Jasin M (2005) Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1110-1115

Naldini L (2011) Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet* 12: 301-315

Papapetrou EP, Lee G, Malani N, Setty M, Riviere I, Tirunagari LM, Kadota K, Roth SL, Giardina P, Viale A et al (2011) Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29: 73-78

Papapetrou EP, Sadelain M (2011) Generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells with an excisable single polycistronic vector. *Nat Protoc* 6: 1251-1273

Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451: 141-146

Porteus MH, Baltimore D (2003) Chimeric Nucleases Stimulate Gene Targeting in Human Cells. *Science* 300: 763

Ramos-Mejia V, Montes R, Bueno C, Ayllon V, Real PJ, Rodriguez R, Menendez P (2012) Residual expression of the reprogramming factors prevents differentiation of iPSC generated from human fibroblasts and cord blood CD34+ progenitors. *PLoS One* 7: e35824

Raya A, Rodriguez-Piza I, Aran B, Consiglio A, Barri PN, Veiga A, Izpisua Belmonte JC (2008) Generation of cardiomyocytes from new human embryonic stem cell lines derived from poor-quality blastocysts. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 127-135

Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castella M, Rio P, Sleep E et al (2009) Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460: 53-59

Rio P, Meza NW, Gonzalez-Murillo A, Navarro S, Alvarez L, Surralles J, Castella M, Guenechea G, Segovia JC, Hanenberg H et al (2008) In vivo proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1. *Blood* 112: 4853-4861

Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, Morel P, Lou J, Trono D (2000) Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther* 2: 404-414

Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, Haddad B, Khayter C, Yeo DT, Goodwin MJ, Hawkins JS, Ramirez CL, Batista LF et al (2011) In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells* 29: 1717-1726

Shimamura A, Alter BP (2010) Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev* 24: 101-122

Smith JR, Maguire S, Davis LA, Alexander M, Yang F, Chandran S, French-Constant C, Pedersen RA (2008) Robust, persistent transgene expression in human embryonic stem cells is achieved with AAVS1-targeted integration. *Stem Cells* 26: 496-504

Soldner F, Laganieri J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, Alagappan R, Khurana V, Golbe LI, Myers RH, Lindquist S et al (2011) Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* 146: 318-331

Somers A, Jean JC, Sommer CA, Omari A, Ford CC, Mills JA, Ying L, Sommer AG, Jean JM, Smith BW et al (2010) Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 28: 1728-1740

Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G (2009) Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 27: 543-549

Tolar J, Adair JE, Antoniou M, Bartholomae CC, Becker PS, Blazar BR, Bueren J, Carroll T, Cavazzana-Calvo M, Clapp DW et al (2011) Stem Cell Gene Therapy for Fanconi Anemia: Report from the 1st International Fanconi Anemia Gene Therapy Working Group Meeting. *Mol Ther* 19: 1193-1198

Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 11: 636-646

Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, de Winter JP, van Berkel CG, Hoatlin ME, Ianzano L, Gibson RA, Arwert F, Savoia A et al (1999) Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat Genet* 22: 379-383

Yang YG, Herceg Z, Nakanishi K, Demuth I, Piccoli C, Michelon J, Hildebrand G, Jasin M, Digweed M, Wang ZQ (2005) The Fanconi anemia group A protein modulates homologous repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Carcinogenesis* 26: 1731-1740

Yung SK, Tilgner K, Ledran MH, Habibollah S, Neganova I, Singhapol C, Saretzki GC, Stojkovic M, Armstrong L, Przyborski SA et al (2012) Brief report: human pluripotent stem cell models of fanconi anemia deficiency reveal an important role for fanconi anemia proteins in cellular reprogramming and survival of hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 31: 1022-1029

Zou J, Mali P, Huang X, Dowey SN, Cheng L (2011a) Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood* 118: 4599-4608

Zou J, Sweeney CL, Chou BK, Choi U, Pan J, Wang H, Dowey SN, Cheng L, Malech HL (2011b) Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood* 117: 5561-5572

FIGURE LEGENDS:

Figure 1: Efficacy of Gene targeting of *FANCA* in the *AAVS1* locus of primary hFA-A fibroblasts. **A)** Top: schematic representation of the donor IDLV- used to promote insertion of the *EGFP/ FANCA* cassette into the *AAVS1* locus Middle: schematic of the *AAVS1* locus with the ZFNs target site indicated. Bottom: schematic of the *AAVS1* locus upon ZFN-mediated targeted insertion of the *EGFP/PGK-FANCA* cassette. Black arrow shows transcription of the *EGFP* from the endogenous *PPP1R12C* promoter. HA: homology arm. SD: Splice donor. SA: Splice acceptor. BGHpA: Bovine Growth Hormone polyadenylation signal. SV40pA: Simian Virus 40 polyadenylation signal. **B)** Representative flow cytometry dot plots of FA-A fibroblasts 14 days after transduction with the donor IDLV \pm the AdV5/35-ZFNs targeting the *AAVS1* locus. **C)** Efficiency of gene targeting measured as EGFP expression by flow cytometry in fibroblasts from four different FA-A patients at the indicated time points. **D)** Comparative analysis of gene targeting FA-A fibroblasts, untransduced or transduced-with a lentiviral vector expressing *hTERT*. Analyses were performed 14 days after gene targeting. **E)** Analysis of the gene targeting efficacy in FA52T cells determined from day 14 to day 42. **F)** Targeted integration analysis of the *EGFP/PGK-FANCA* cassette into the *AAVS1* site by - PCR using primers specific for the 5' or 3' integration junctions (red arrows in the top schematic) defined as 5'TI or 3' TI respectively.

Figure 2. Phenotypic correction of the gene-edited FA-A fibroblasts. **A)** Top: histogram showing the percentage of FANCD2 foci positive cells t in FA-A fibroblasts untransduced or co-transduced with the donor IDLV and the AdV5/35-ZFNs. Data are shown as Mean \pm SE of three independent experiments. Bottom: representative images of FANCD2 foci (red) in cells shown in top histogram after MMC treatment. **B)** Chromosomal instability induced by Diepoxibutane (DEB) in untreated (FA-52T) and gene-edited fibroblasts (geFA-52T). Left: representative FISH analysis was performed by staining telomeres (in green),centromeres (in pink) and chromosomes (in blue). Right: histogram showing the number of chromosomal aberrations per 20 metaphases. Dotted line indicates the basal

aberration levels corresponding to non DEB-treated healthy fibroblasts. Chromt break: Chromatid break. Chrom: Chromosome.

Figure 3. Pluripotency characterization and insertion site analyses of the gene-edited FA-A iPSCs. **A)** Expression of TRA1-60, SSEA-4, OCT4 and NANOG pluripotency markers by immunofluorescence staining of gene-corrected FA-iPSCs. **B)** RT-qPCR analysis of *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC* and *REX 1* in geFA-iPSCs. Levels of expression were normalized to a constitutive gene (*GADPH*) and relative expression in comparison with a control ES4 line is shown. **C)** Hematoxylin/eosin staining of teratomas generated from ge-FA-iPSC16. Tissues representing the three germ layers (ecto-, meso- and endoderm) were identified: Ectoderm is represented by cutaneous cells, endoderm mucosous epithelium including globet cells, and endoderm by bone and pancreatic acinar cells with excretory tubule. Lower panels show immunofluorescence analysis of Ectoderm (B-II-Tubulin), endoderm (Fox2A) and Mesoderm (α -SMA and Brachyury). **D)** Bisulfite sequencing analysis of *OCT4* and *NANOG* promoters in ge-FA-iPSCs 16, ge-FA-iPSCs 26 and ge-FA-iPSCs 31 in comparison with healthy donor (HD) fibroblasts. White circles represent unmethylated CpG dinucleotides while black circles represent methylated CpG dinucleotides. Total percentage of methylated CpG of all the test clones is also shown. **E)** Southern blot analysis of genomic DNA extracted from the indicated gene corrected FA iPSC clones (geFA-iPSCs) and from parental fibroblasts, either unmanipulated (FA-A) or after gene editing (ge-FA-A). Genomic DNA was digested with Bgl II and hybridized with a probe for *PPP1R12C*. The band of 5.3 kb corresponds to the targeted integration in *PPP1R12C*, while the 3.5 kb correspond to the untargeted allele. **F)** Southern blot analysis of samples shown in panel E digested with BstXI and hybridized with a probe (P) for *EGFP*. One single band of 5.1 Kb is expected for specific integrations in *PPP1R12C*.

Figure 4. Disease-free Fanconi anemia phenotype of corrected geFA-iPSCs

A) Histogram showing the levels of *hFANCA* expression in gene edited FA-iPSC clones and human ES (H9) relative to untreated FA-52T fibroblasts. Data are shown as Mean \pm SE of three different analyses. **B)** Western blot analysis

showing FANCA expression in geFA-iPSCs clones in comparison with fibroblasts from HD and a FA-A patient. **C)** Representative immunofluorescence analysis of FANCD2 foci in geFA-IPSCs after DNA damage with MMC. **D)** Chromosomal instability induced by Diepoxibutane (DEB) was also tested in geFA-IPSC 16. FISH analysis was performed using probes to detect telomeres (in green), centromeres (in pink) and chromosomes (in blue). Right: histogram showing the number of chromosomal aberrations per 20 metaphases analyzed. Dotted line indicates the basal aberration levels corresponding to non DEB-treated healthy fibroblasts. Chrom: Chromosome.

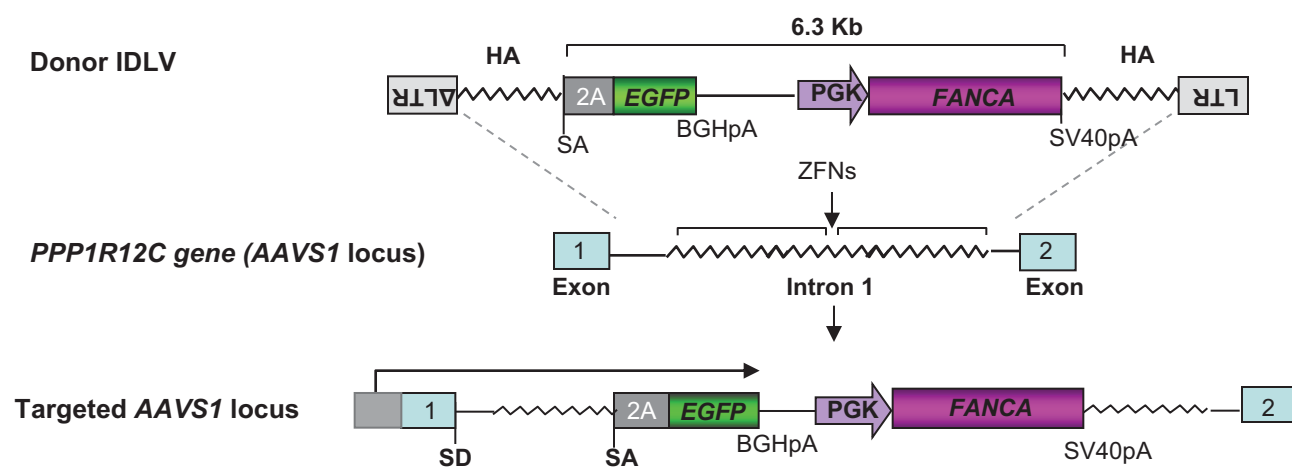
Figure 5. Characterization of geFA-iPSC clone 16 after Cre-mediated excision OKSM of the reprogramming LV. **A)** RT-qPCR analysis of the expression of endogenous and ectopic pluripotency-related genes in excised geFA-IPSC clone 16. *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC* and *REX1*. Levels of expression were normalized to a constitutive gene (*GADPH*) and an ES4 control line. **B)** Hematoxylin and eosin staining of teratoma sections generated from geFA-iPSC 16 after excision of OKSM genes showing tissues representing the three germ layers (ecto-, meso- and endoderm). Lower panel also show immunofluorescence of different markers confirming the differentiation into the three germ layers: Ectoderm (B-II-Tubulin), endoderm (Fox2A) and Mesoderm (α -SMA and Brachyury). **C)** Bisulfite sequencing analysis of *OCT4* and *NANOG* promoters in Excised ge-FA-iPSCs 16 in comparison with original ge-FA-iPSCs 16 and parental fibroblasts.. White circles represent unmethylated CpG dinucleotides while black circles represent methylated CpG dinucleotides. Total percentage of methylated CpG of all the test clones is also shown.

Figure 6. Hematopoietic differentiation of corrected geFA-IPSCs clone 16. **A)** Representative flow cytometry dot plots of human CD34⁺ and CD45⁺ hematopoietic cells obtained by *in vitro* differentiation of geFA-iPSCs 16 before and after Cre-mediated excision of OSKM factors (geFA-iPSCs 16Ex). **B)** Histogram showing the percentage of CD43⁺CD34⁺, CD45⁺CD34⁺ and CD45⁺ cells both before (white bars) and after (black bars) excision of the reprogramming cassette. **C)** Microphotographies of hematopoietic progenitors (CFU-GMs and BFU-Es)

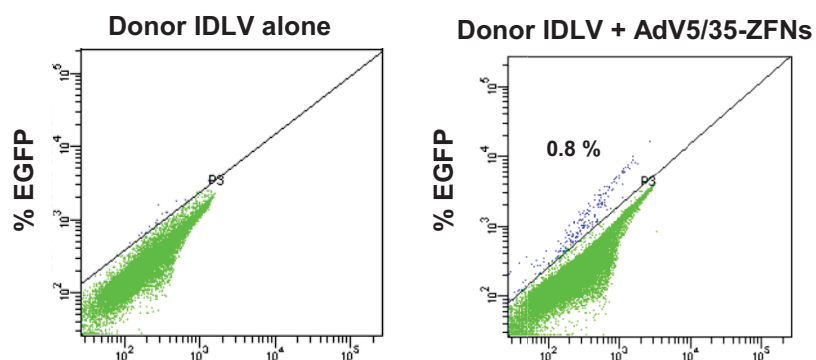
obtained from geFA-iPSCs 16 and 16Ex. **D)** Histogram showing the clonogenic potential of geFA-iPSCs 16 and 16Ex. **E)** Survival to MMC of CFCs obtained from geFA-iPSCs 16 in comparison with BM samples from two different FA patients (FA-664 BM and FA-82 BM) and from a healthy cord blood (HD CB).

Figure 1

A



B



C

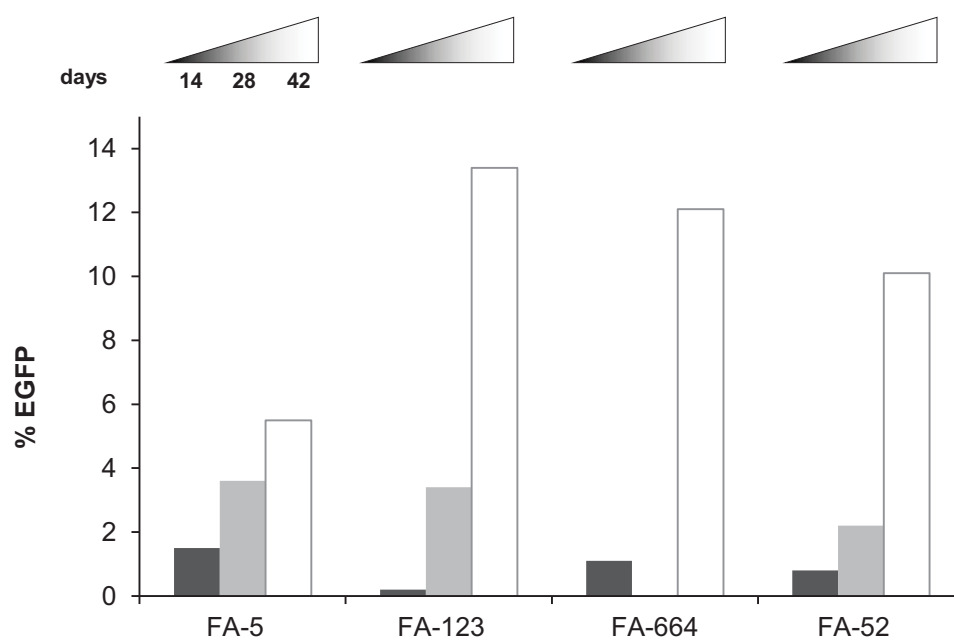
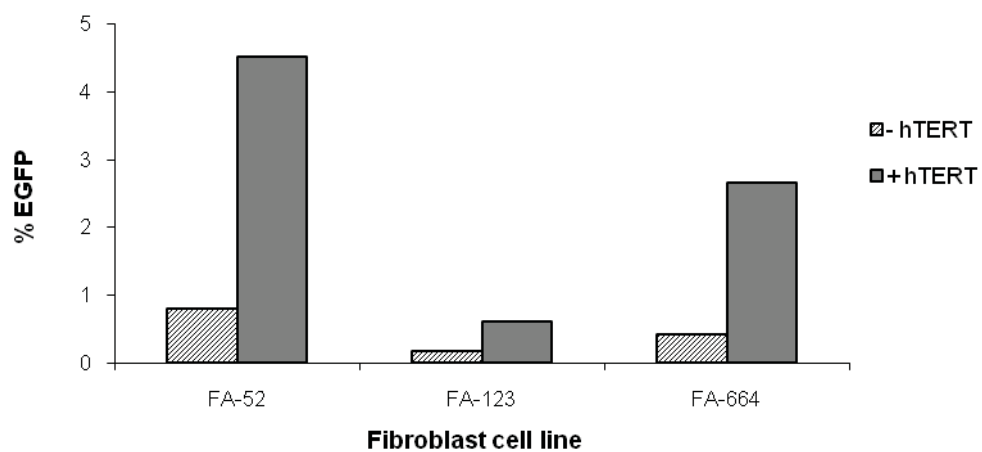
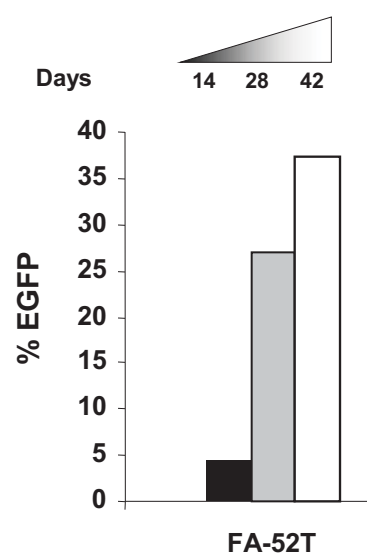


Figure 1

D



E



F

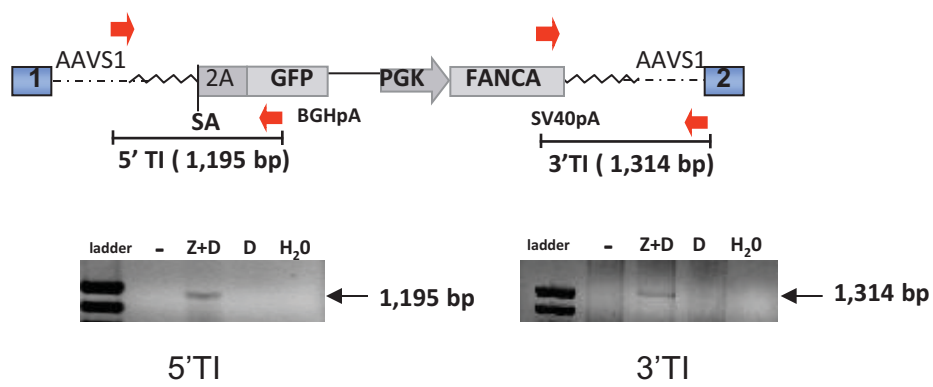


Figure 2

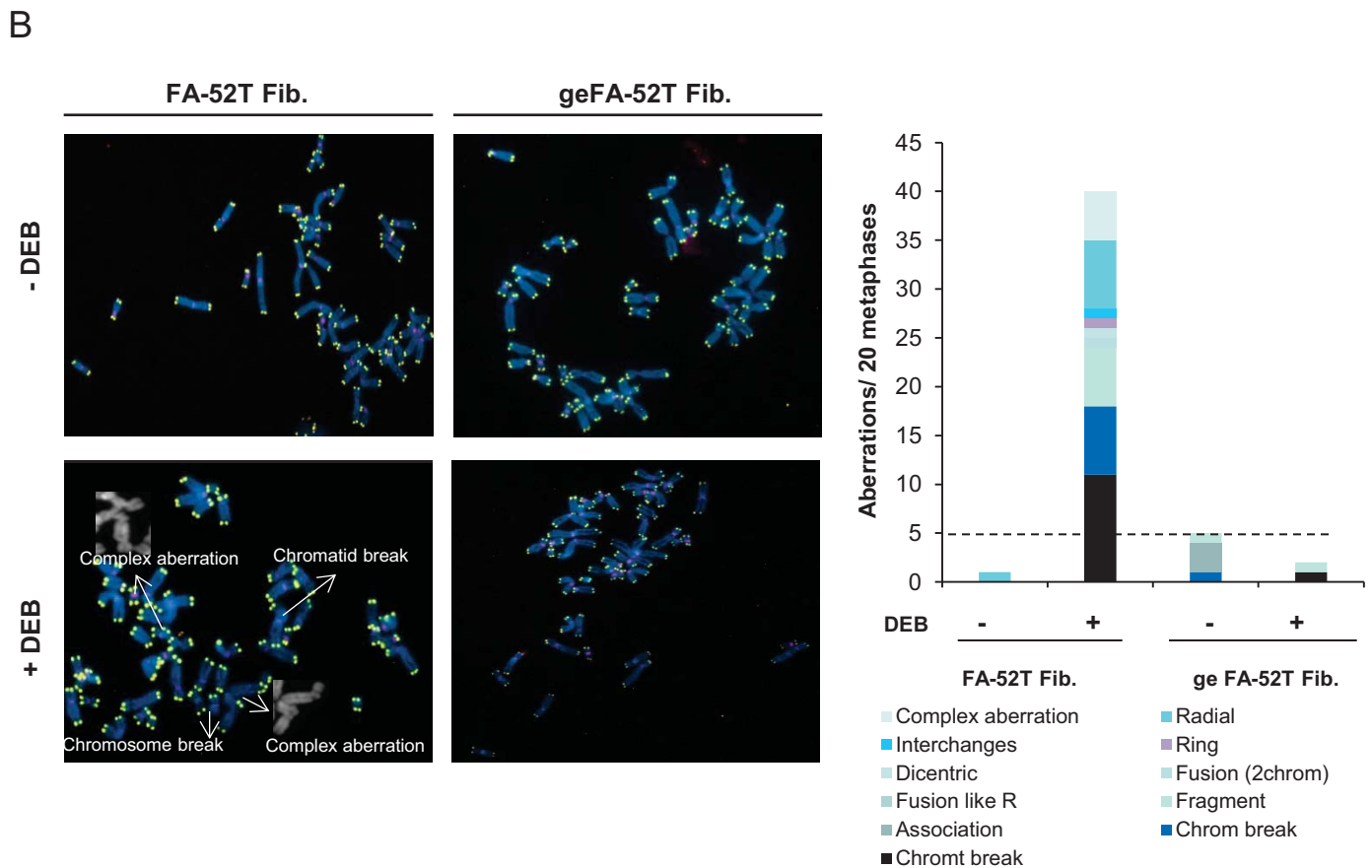
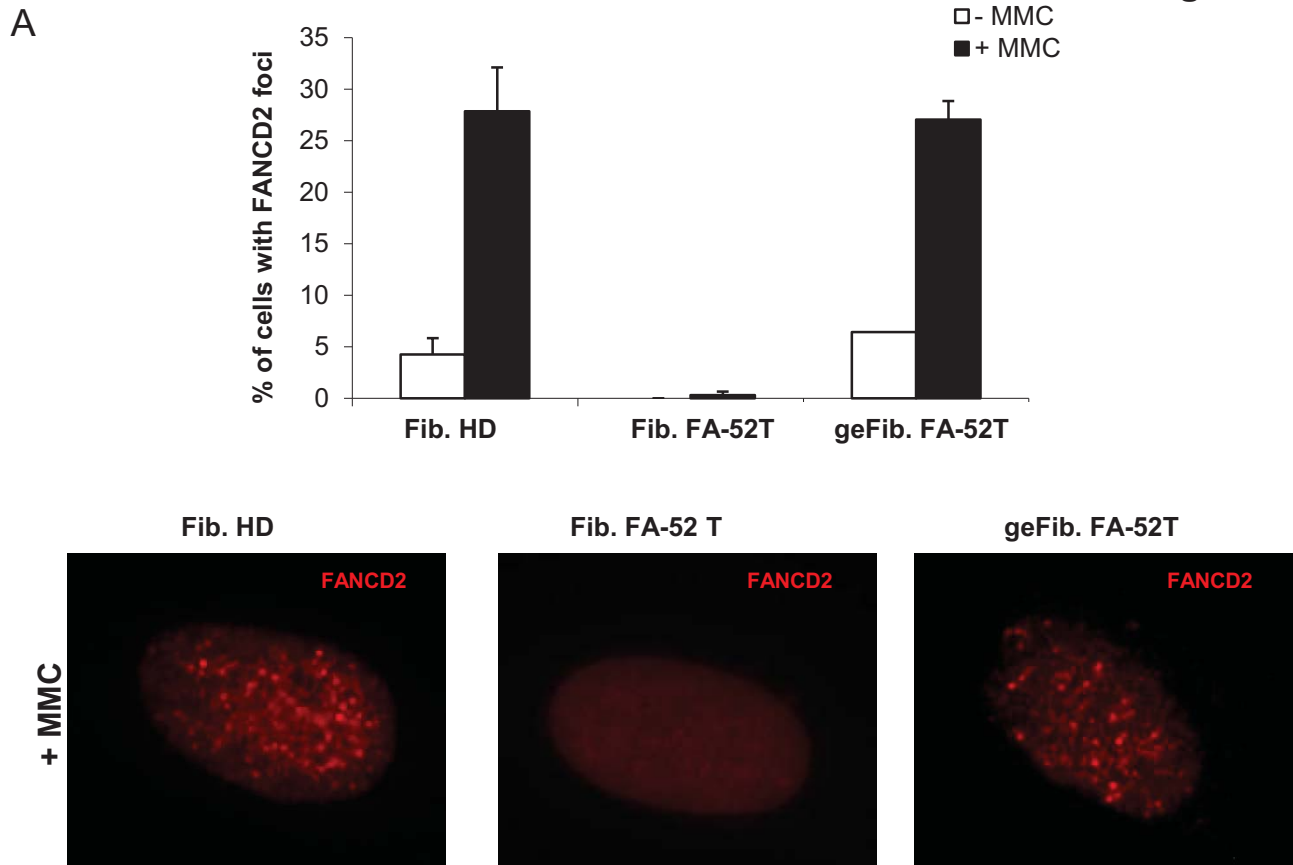
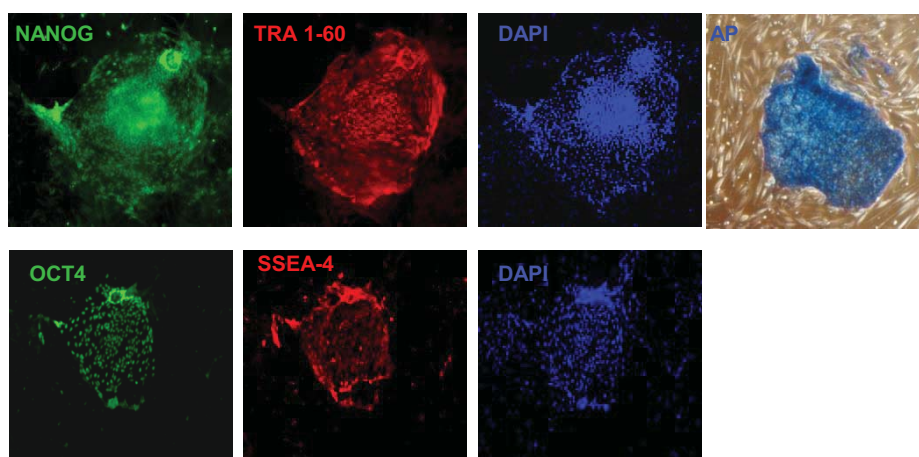


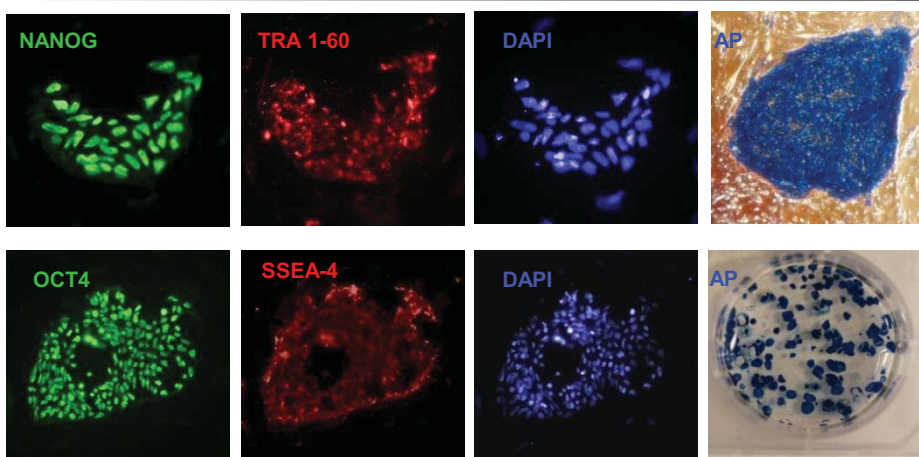
Figure 3

A

geFA-iPSCs: Clone 16



geFA-iPSCs: Clone 26



geFA-iPSCs: Clone 31

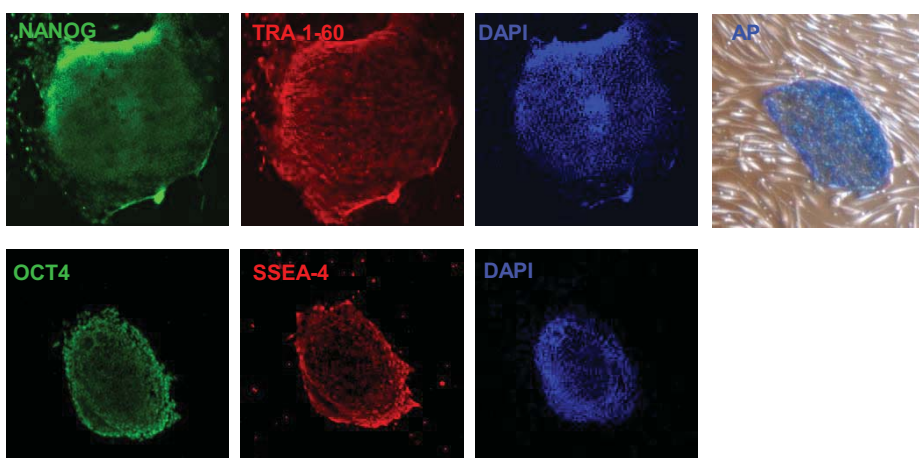
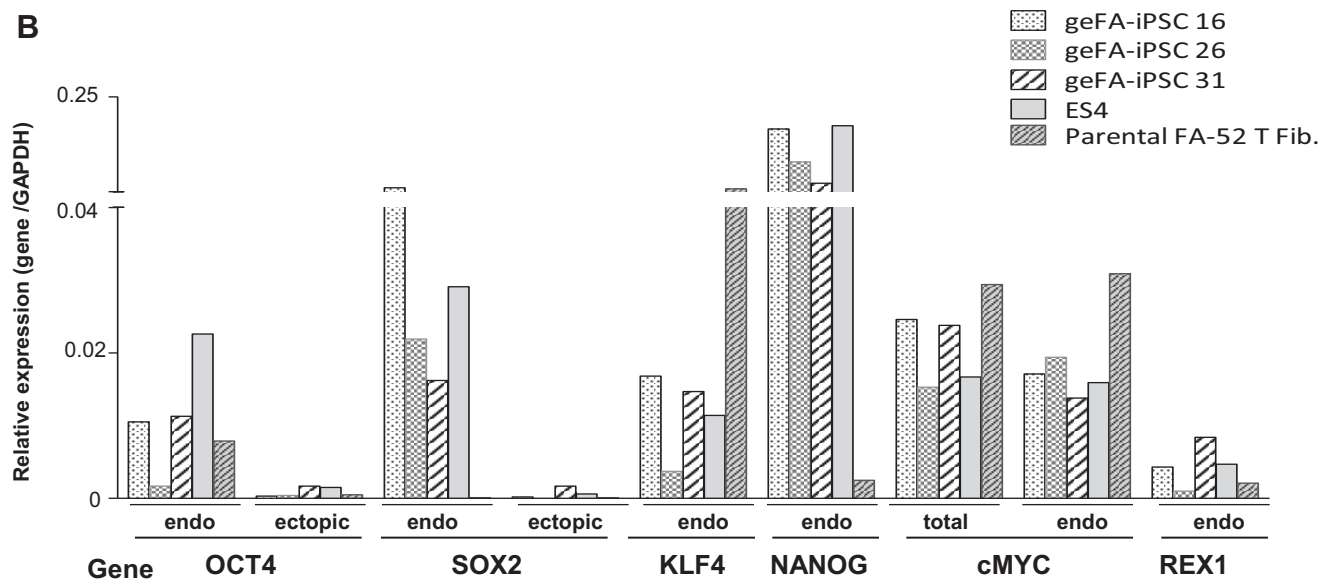


Figure 3

B



C

Teratome from geFA-iPSCs: Clone 16

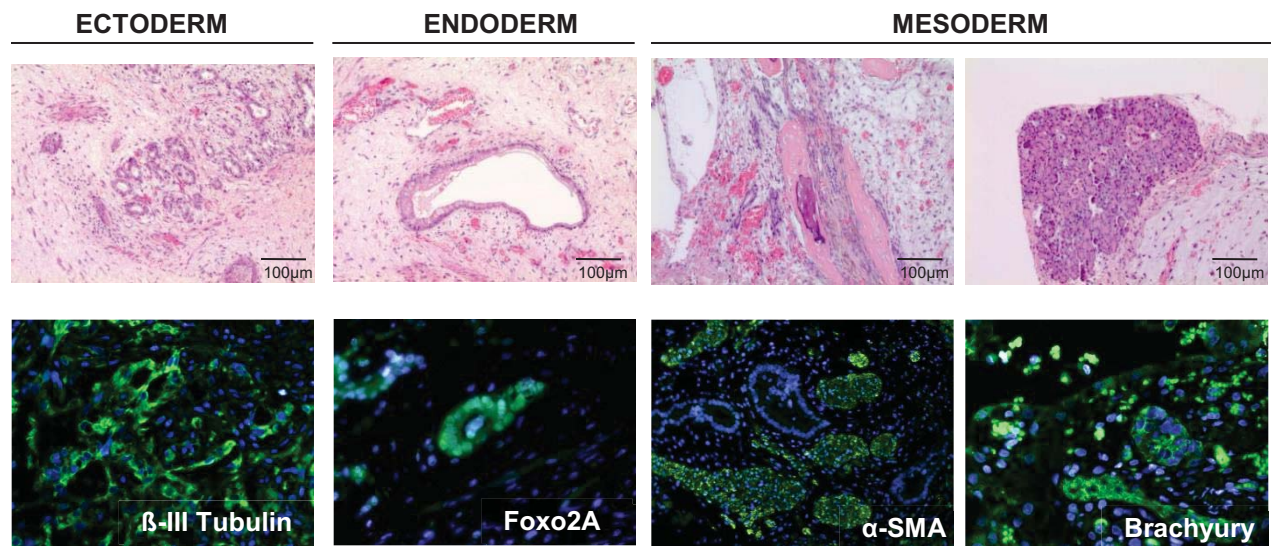


Figure 3

D

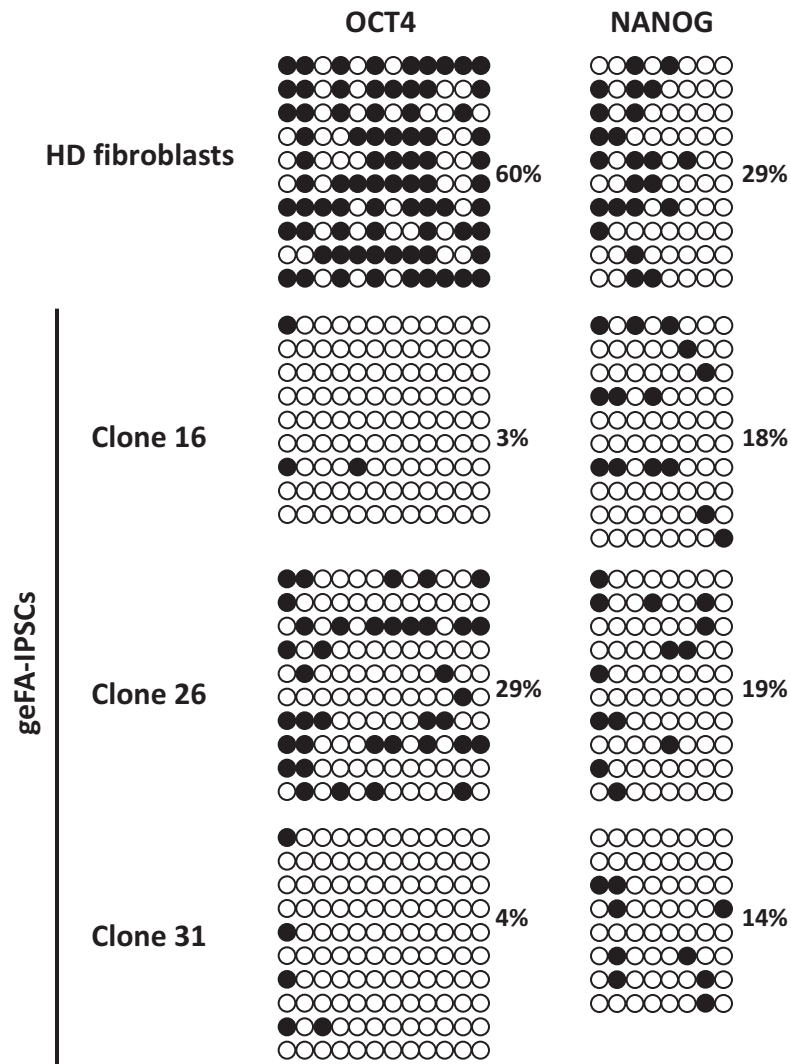
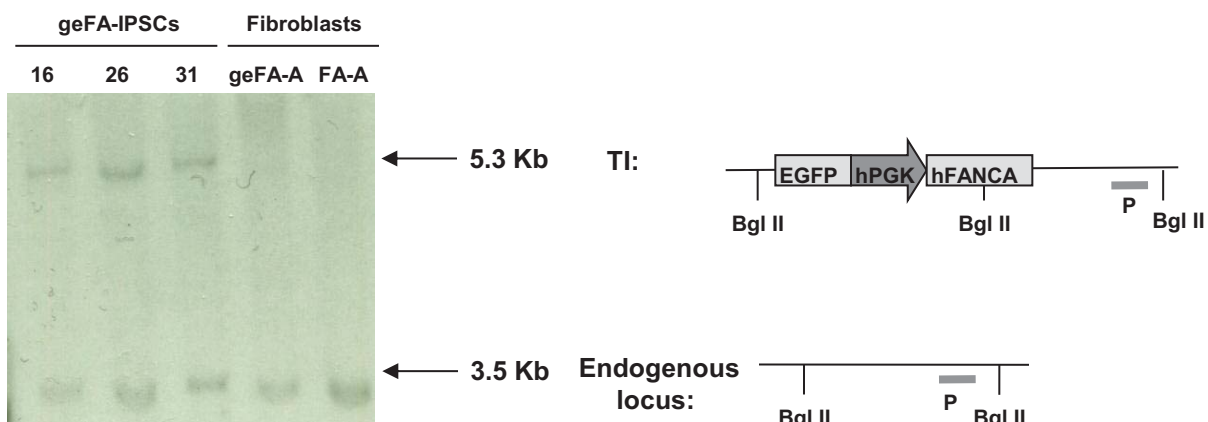


Figure 3

E



F

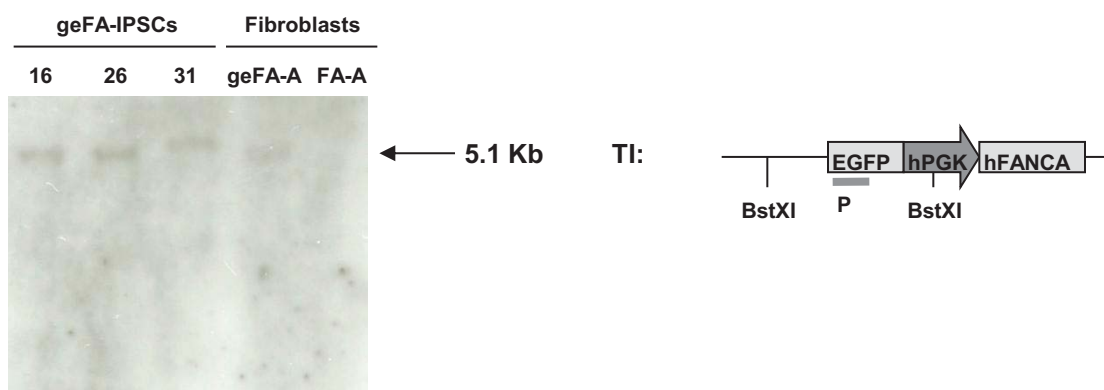
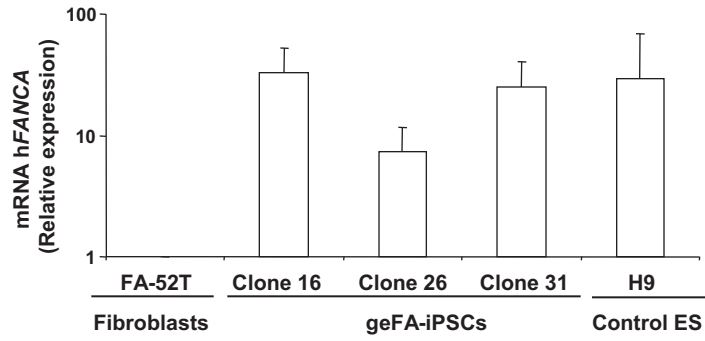
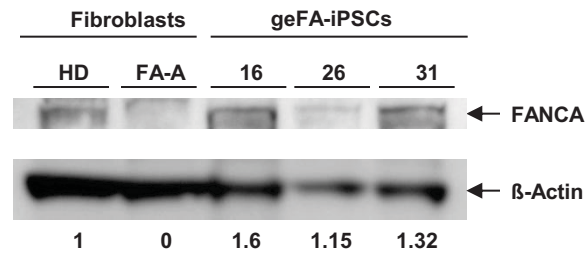


Figure 4

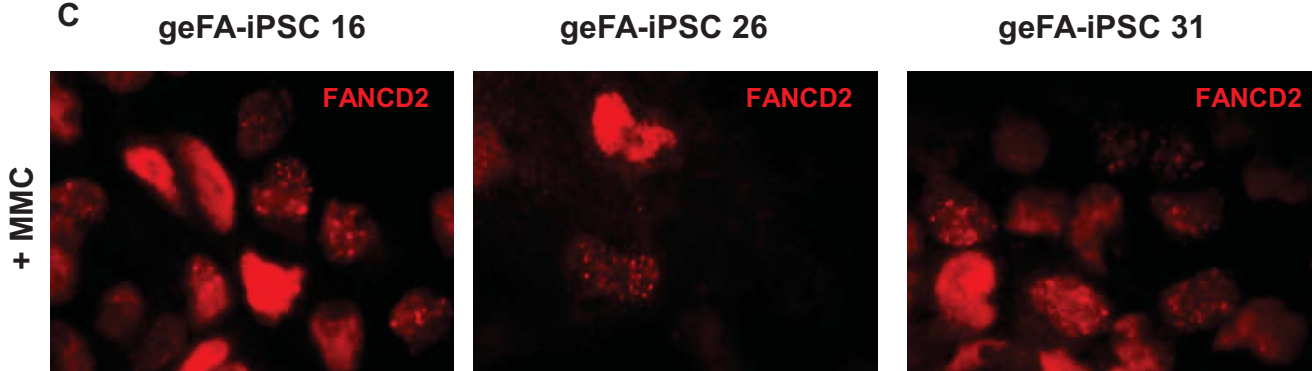
A



B



C



D

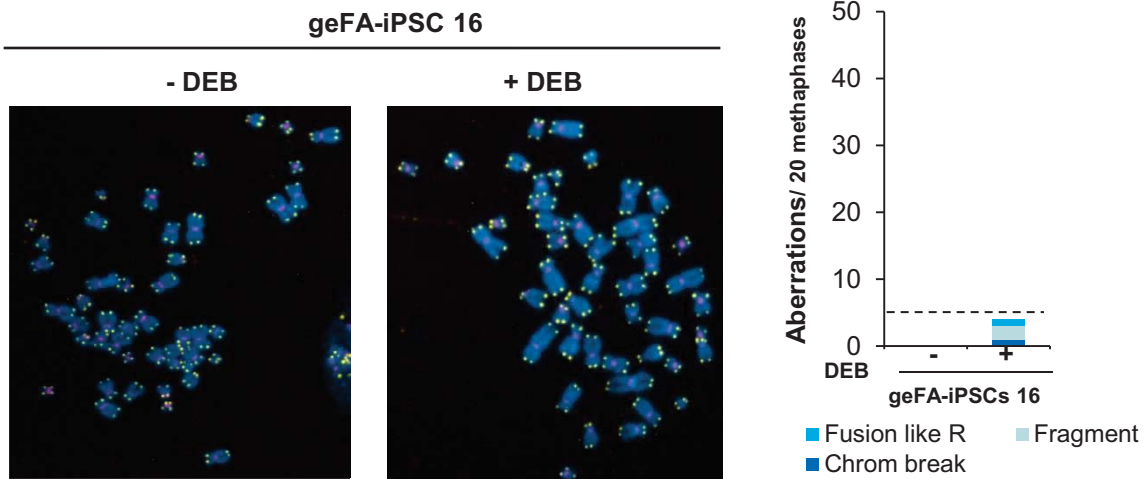


Figure 5

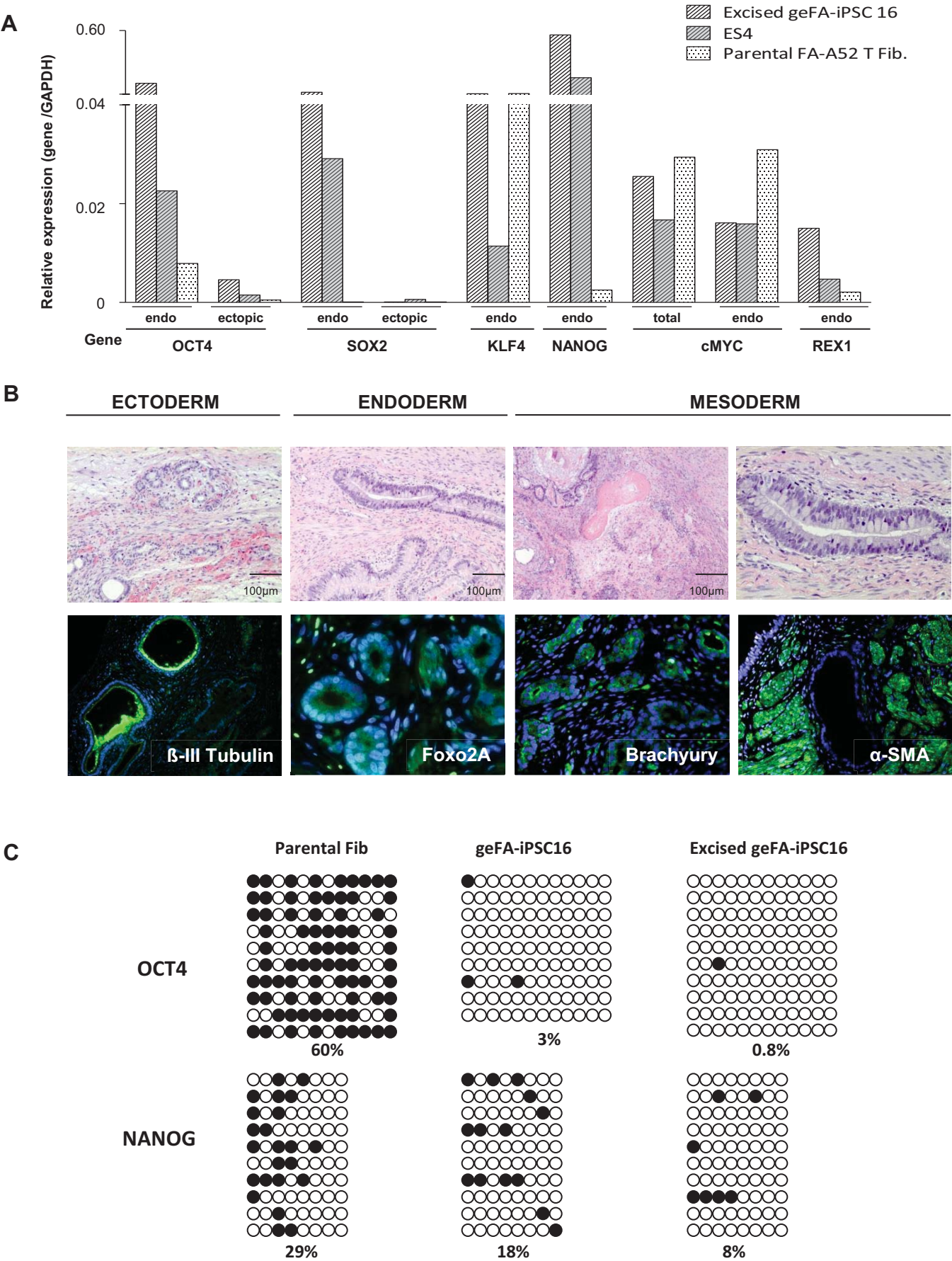
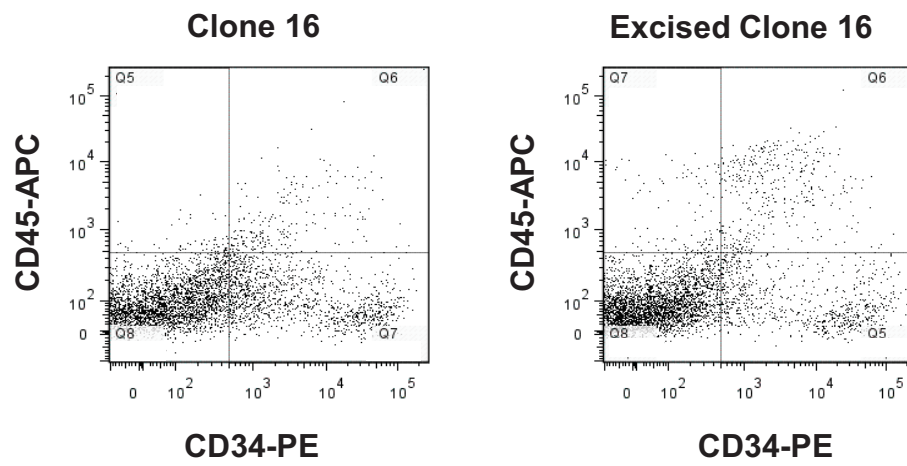


Figure 6

A

GE-iPSCs



B

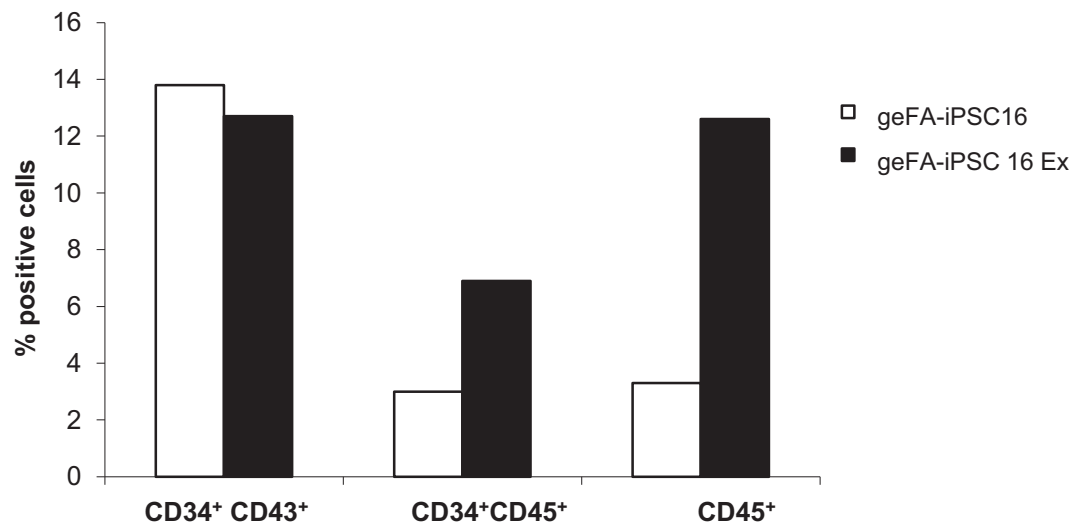
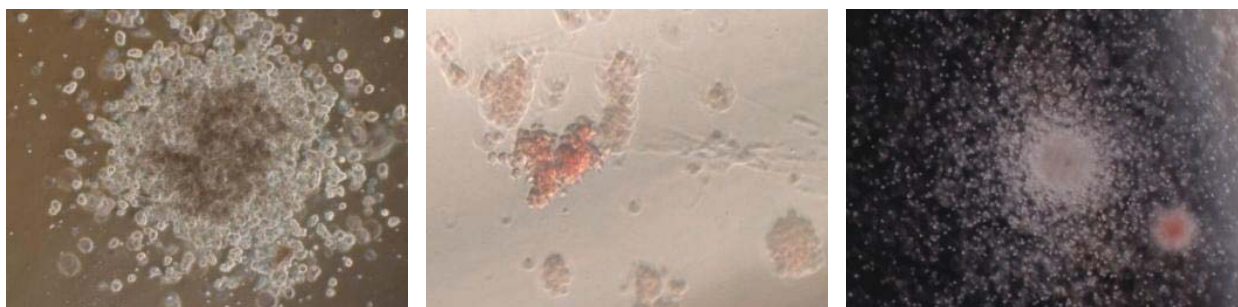


Figure 6

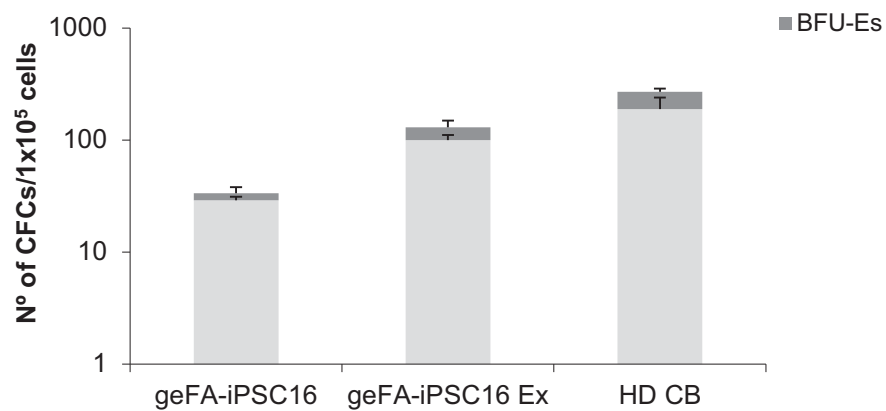
C



geFA-iPSC 16

geFA-iPSC 16 Ex

D



E

